

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**JÉSSICA ANTONINI TROIANO**

Avaliação de mecanismos de modificação pós-traducional da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) associados a biodisponibilidade do óxido nítrico em artérias de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ao final da prenhez

**ARAÇATUBA**

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**JÉSSICA ANTONINI TROIANO**

Avaliação de mecanismos de modificação pós-traducional da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) associados a biodisponibilidade do óxido nítrico em artérias de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ao final da prenhez

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Antoniali Silva

**ARAÇATUBA**

**2019**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T845a	<p>Troiano, Jéssica Antonini.</p> <p>Avaliação de mecanismos de modificação pós-translational da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) associados a biodisponibilidade do óxido nítrico em artérias de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ao final da prenhez / Jéssica Antonini Troiano. – Araçatuba, 2019 115 f. : il. ; tab.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva</p> <p>1. Aorta 2. Artérias mesentéricas 3. Óxido nítrico sintase Endotelial 4. Calmodulina 5. Caveolina 1 6. Glicosilação 7. Hipertensão 8. Prenhez 9. Proteínas de Choque Térmico HSP90 I. T.</p> <p style="text-align: right;">CDD 612</p>
-------	---

## **DADOS CURRICULARES**

### **JÉSSICA ANTONINI TROIANO**

**Nascimento:** 08.03.1991, Dracena - SP.

**Filiação:** Marlei Antonini do Vale Troiano  
Décio Aparecido Troiano

#### **Formação Acadêmica**

##### **2015 – 2019: Doutorado em Ciências Fisiológicas**

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo 2015/09373-0) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

Orientação: Profa Associada Dra Cristina Antoniali Silva

Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Campus de Araçatuba, SP, Brasil.

##### **2013 – 2015: Mestrado em Ciências Fisiológicas**

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Bolsista da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

Orientação: Profa Associada Dra Cristina Antoniali Silva

Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Campus de Araçatuba, SP, Brasil.

##### **2009 – 2012: Graduação em Farmácia**

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

#### **Produções**

##### **Artigo submetido**

1- **Troiano, Jéssica A.** ; Potje, Simone R. ; Graton, Murilo E. ; Silva, Daniela S. ; Costa, Rafael M. ; Tostes, Rita ; Antoniali, Cristina. **O-GlcNAc-protein content is decreased in blood vessels of pregnant normotensive and hypertensive rats. Vascular Pharmacology (submetido VPH\_2019\_66).**

##### **Artigos publicados**

- 1- Graton, Murilo E. ; Potje, Simone R. ; **Troiano, Jéssica A.** ; Vale, Gabriel T. ; Perassa, Ligia A. ; Nakamune, Ana Cláudia M.S. ; Tirapelli, Carlos R. ; Bendhack, Lusiane M. ; Antoniali, Cristina. **Apocynin alters redox signaling in conductance and resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. Free Radic Biol Med, v. 134, p. 53-63, 2019.** doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.026.
- 2- Potje, Simone R. : **Troiano, Jéssica A.** ; Grando Marcela D. ; Graton, Murilo E. ; da Silva, Roberto S. ; Bendhack, Lusiane M. ; Antoniali, C. **Endothelial modulation of a nitric oxide donor complex-induced relaxation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. Life Sci., v. 15, p. 130-140, 2018.** doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.055.
- 3- Potje, Simone R. ; **Troiano, Jéssica A.** ; Graton, Murilo E. ; Ximenes, Valdecir F. ; Nakamune, Ana Cláudia M.S. ; Antoniali, Cristina . **Hypotensive and vasorelaxant effect of Diapocynin in normotensive rats. Free Radical Biology & Medicine, v. 106, p. 148-157, 2017.** doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.026.
- 4- **Troiano , Jéssica A.** ; Potje, Simone R. ; Graton, Murilo E. ; Cavalari, Priscila ; Pereira, Ariana A.F. ; Vale, Gabriel T. ; Nakamune, Ana Cláudia M.S. ; Sumida, Dóris H. ; Tirapelli, Carlos R. ; Antoniali, Cristina. **Decreased reactive oxygen species production and NOX1, NOX2, NOX4 expressions contribute to hyporeactivity to phenylephrine in aortas of pregnant SHR. Life Sciences (1973), v. 144, p. 178-184, 2016.** doi: 10.1016/j.lfs.2015.12.011.
- 5- Perassa, Ligia A. ; Graton, Murilo E. ; Potje, Simone R. ; **Troiano, Jéssica A.** ; Lima, Mariana S. ; Vale, Gabriel T. ; Pereira, Ariana A.F. ; Nakamune, Ana Cláudia M.S. ; Sumida, Doris H. ; Tirapelli, Carlos R. ; Bendhack, Lusiane M. ; Antoniali, Cristina . **Apocynin reduces blood pressure and restores the proper function of vascular endothelium in SHR. Vascular Pharmacology, v. 87, p. 38-48, 2016.** doi: 10.1016/j.vph.2016.06.005.
- 6- Da Silva, Priscila V. ; **Troiano, Jéssica A.** ; Nakamune, Ana Cláudia M.S. ; Pessan, Juliano P. ; Antoniali, Cristina . **Increased activity of the antioxidants systems modulate the oxidative stress in saliva of toddlers with early childhood caries. Archives of Oral Biology, v. 70, p. 62-66, 2016.** doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.06.003.
- 7- Zancheta, Dalise; **Troiano, Jéssica A.** ; Potje, Simone R. ; Cavalari, Priscila ; Sumida, Dóris H. ; Antoniali, Cristina . **The PI3K-Akt-eNOS pathway is involved in aortic hyporeactivity to Phenylephrine associated with late pregnancy in spontaneously hypertensive rats. Life Sciences (1973), v. 122, p. 78/-86, 2015.** doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.014.

8- Potje, Simone R.; Hildebrand, Mariana C. ; Munhoz, Felipe C. ; **Troiano, Jéssica A.** ; Pereira, Ariana A. F. ; Nakamune, Ana Cláudia M. S. ; Da Silva, Roberto S. ; Bendhack, Lusiane M. ; Antoniali, Cristina . **The hypotensive effect of the ruthenium complex [Ru(terpy)(bdq)NO]3+ is higher in male than in female spontaneously hypertensive rats (SHR).** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 387, p. 1045-1051, 2014. doi: 10.1007/s00210-014-1020-2.

**Trabalhos apresentados (como primeira autora, considerando a partir de 2015)**

***Experimental Biology (EB) Meeting – 2019***

➤ **Troiano, J.A.**; Graton, M. E.; Potje, S.R.; Gonçalves, E. T.; Zanardo, J. L. O. F.; Benevides, P. S.; Antoniali, C. Distinct role of endothelial caveolae in contraction and relaxation responses of aortas from pregnant normotensive and hypertensive rats.

***XXIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular – 2019***

➤ **Troiano, J.A.**; Potje, S.R.; Graton, M.E.; Goncalves, E. T.; Zanardo, J. L. O. F.; Antoniali, C. O aumento da fosforilação da caveolina-1 e da calmodulina contribuem para maior atividade da óxido nítrico sintase endotelial em aorta de SHR prenhes.

***VI Encontro Científico Nacional: 10 anos do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da SBFis – 2019***

➤ **Troiano, J.A.**; Graton, M. E.; Potje, S.R.; Gonçalves, E. T.; Zanardo, J. L. O. F.; Antoniali, C. Regulação da enzima óxido nítrico sintase endotelial por caveolina-1, calmodulina e hsp90 em aorta de ratas hipertensas prenhes.

***50th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE) – 2018***

➤ **Troiano, J.A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Costa, L. O.; Zanardo, J. L. O. F.; Tostes, R.C.; Antoniali, C. O-GlcNAcylation and the Enzymes Involved in this Post-translational Modification in Blood Vessels of Normotensive and Hypertensive Pregnant Rats.

***XXXIII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE) – 2018***

➤ **Troiano, J.A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Costa, L. O.; Zanardo, J. L. O. F.; Tostes, R.C.; Antoniali, C. Increased OGA activity decreases vascular proteins O-GlcNAcylation contributing to the reduced phenylephrine reactivity in blood vessels of pregnant Wistar rats.

**8º Congresso de Odontologia da FOA-UNESP – 2018**

➤ **Troiano, J.A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Costa, L. O.; Zanardo, J. L. O. F.; Antoniali, C. A expressão da O-GlcNAc está diminuída e a atividade da OGA está aumentada em aorta e artéria mesentérica de ratas prenhes.

**XXII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular – 2018**

➤ **Troiano, J.A.**; Teixeira, T. D. M.; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Bendhack, L. M.; Antoniali, C. Efeito da dextrina sobre a reatividade à fenilefrina e acetilcolina em aorta de ratos machos e fêmeas Wistar e SHR.

**49<sup>th</sup> Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE) – 2017**

➤ **Troiano, J. A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Antoniali, C. Pregnancy reduces O-GlcNAc expression in blood vessels from normotensive and hypertensive rats.

**IV Simpósio em Biologia Vascular – 2017**

➤ **Troiano, J. A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Antoniali, C. Pregnancy reduces O-GlcNAc expression in blood vessels from normotensive and hypertensive rats.

**38<sup>th</sup> World Congress of the International Union of Physiological Sciences – 2017**

➤ **Troiano, J.A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Antoniali, C. O-GlcNAc type glycosylation is decreased in pregnant Wistar rats.

**Experimental Biology (EB) Meeting – 2017**

➤ **Troiano, J. A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Antoniali, C. O-GLCNAC-ENOS is decreased in blood vessels from pregnant wistar rats, but not in vessels from pregnant SHR.

**XXI Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular- 2017**

➤ **Troiano, J. A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Antoniali, C. A atividade da O-GlcNAcase (OGA) está aumentando em aortas de ratas Wistar prenhas, mas não está alterada em artérias mesentéricas de SHR prenhas.

**V Congresso Odontológico de Araçatuba- 2015**

➤ **Troiano, J. A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Silva, P. V.; Antoniali, C. A prenhez não modula a expressão da superóxido dismutase (SOD) em aortas de ratas espontaneamente hipertensas (SHR).

**XIX Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular- 2015**

➤ **Troiano, J. A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Pereira, A. A. F.; Nakamune, A. C. M. S.; Antoniali, C. As espécies reativas de oxigênio e o dano oxidativo estão diminuídos em aorta de ratas normotensas e hipertensas no final da prenhez.

#### ***47º Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics- 2015***

➤ **Troiano, J. A.**; Potje, S. R.; Graton, M. E.; Silva, D. S.; Ximenes, V. F.; Antoniali, C. Apocynin has higher potency than diapocynin to induce vasodilation in mesenteric resistance arteries of Wistar rats.

#### **Prêmios**

➤ Menção Honrosa pelo trabalho "**O-GLCNACYLATION AND THE ENZYMES INVOLVED IN THIS POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION IN BLOOD VESSELS OF NORMOTENSIVE AND HYPERTENSIVE PREGNANT RATS**", Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental- SBFTE. (2018)

➤ Menção Honrosa pelo trabalho "**A PRENHEZ NÃO MODULA A EXPRESSÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM AORTAS DE RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)**", V Congresso Odontológico de Araçatuba. (2015)

#### **Participação em Auxílios**

Durante o período de doutorado teve colaboração direta no projeto de Auxílio Regular à Pesquisa vigente no laboratório, sob responsabilidade da Profa Dra Cristina Antoniali Silva (Processo FAPESP 2016/22180-9) e colaboração na orientação dos alunos: Daniela de Souza Silva (Bolsa IC FAPESP 2015/08188-4), Emily Thalia Gonçalves (Bolsa IC FAPESP 2018/10635-7) e Luisa de Oliveira Costa (Bolsa IC PIBIC-CNPq).

#### **Estágio Docência**

Estágio docência na graduação, realizado na disciplina de Farmacologia, sob supervisão da Profa Dra Cristina Antoniali no curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA-UNESP no primeiro e segundo semestre de 2016, totalizando 106 horas.

#### **Participação de Bancas de Comissões Julgadoras**

**2018:** - 8º Congresso de Odontologia da FOA-UNESP  
- XXX Congresso de Iniciação Científica da Unesp



**2017:** - VII Congresso da Faculdade de Odontologia de Araçatuba

**2016:** - XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp

**2015:** - XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp  
- V Congresso da Faculdade de Odontologia de Araçatuba

### **Organização de Eventos**

**2019:**

- ✓ VI Curso de Inverno em Ciências Fisiológicas FOA/UNESP/SBFis

**2018:**

- ✓ 8º Congresso de Odontologia da FOA-UNESP
- ✓ V Curso de Inverno em Ciências Fisiológicas FOA/UNESP/SBFis
- ✓ XXX Congresso de Iniciação Científica

**2017:**

- ✓ IV Curso de Inverno em Ciências Fisiológicas FOA/UNESP/SBFis
- ✓ XXXII Semana de Prevenção da Hipertensão e VI Semana da Saúde

**2016:**

- ✓ XXXI Semana de Prevenção da Hipertensão e VI Semana da Saúde
- ✓ III Curso de Inverno em Ciências Fisiológicas FOA/UNESP/SBFis

**2015:**

- ✓ II Curso de Inverno em Ciências Fisiológicas FOA/UNESP/SBFis
- ✓ XXXI Semana de Prevenção da Hipertensão e VI Semana da Saúde

### **Participação no Conselho Local do PPGMCF**

- Representante discente (membro suplente) junto ao Conselho Local do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas nos períodos: 2017-2018 e 2018-2019.

### **Links**

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3913068784713079>

ResearchGate: [https://www.researchgate.net/profile/Jessica\\_Antonini\\_Troiano](https://www.researchgate.net/profile/Jessica_Antonini_Troiano)

*Dedico este trabalho aos meus pais, Marlei e Délcio, e aos meus irmãos, Andressa e Dener, por andarem ao meu lado em toda minha caminhada. São meus maiores incentivadores, meus maiores alicerces e meus maiores torcedores. Sou muito grata a Deus por ter me proporcionado vocês como minha família.  
Amo muito vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Nossa Senhora, por me ampararem me dando força e proteção em toda a minha caminhada.

A professora Dra. Cristina Antoniali Silva, minha orientadora, que desde o mestrado me acolheu em seu laboratório, e que muito além de minha orientadora é minha amiga e minha inspiração como mulher, professora e pesquisadora. Agradeço imensamente todas as oportunidades e responsabilidades que ela me deu e que sempre me fizeram amadurecer pessoalmente e profissionalmente. Sempre levarei comigo todos seus ensinamentos e o exemplo de uma profissional tão humana. Minha eterna gratidão por tudo!

Ao grupo de pesquisa da professora Dra. Cristina: Simone Potje, Murilo Graton, Daniela Souza, Heitor Araujo, Jéssica Zanardo, Emily Gonçalves, Priscila Benevides, Andrea Soares e Pedro Souza pela convivência, ajuda e momentos prazerosos de pesquisa. Em especial, agradeço imensamente os meus queridos e amados amigos Simone Potje e Murilo Graton, por serem os meus anjos da guarda e me ampararem sempre quando foi preciso, por serem pessoas do bem e me motivarem ao longo destes anos, amo vocês.

Aos professores da banca examinadora, Dra. Angela de Castro Resende, Dra. Graziela Scaliante Ceravolo, Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior e Dr. Fernando Silva Carneiro pela participação e contribuição neste trabalho.

A professora Dra. Sandra de Oliveira pelo uso de equipamentos em seu laboratório.

A professora Dra. Rita Tostes pelo experimento conduzido em seu laboratório e seu aluno Dr. Rafael Menezes, pela assistência na execução deste.

Ao professor Dr. Cláudio Cassatti e seu aluno de doutorado Gestter Tessarin pelo uso de equipamentos em seu laboratório.

A professora Dra. Lusiane Maria Bendhack, por ceder seu laboratório para realização de parte dos experimentos de microscopia eletrônica e por todo o seu entusiasmo em partilhar sugestões que enriquecem nossos trabalhos.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, Dra. Sandra Oliveira, Dra. Ana Cláudia Nakamune, Dra. Rita Dornelles, Dr. Antônio Hernandes, Dra. Dóris Sumida, Dr. Wilson Galego e Dr. João Callera pela ajuda, colaboração e aprendizado durante esta jornada.

Aos amigos do Departamento de Ciências Básicas: Victor Balera, Beatriz Balassoni, Bianca Ribeiro, Milena Nunes, José Jordão, Mariana Sousa, Carolina Linjardi, Sabrina Tfaile, Aline Takamiya, Kellen Tjioe, Angela Nicola, Ayná Barreto, Rodrigo Cano, Caroline Shibuya, Noélla Kill, Fernanda Fernandes, Melise Ueno, Maria Sara Mattera, Thais Tsoura, Renato Pereira e Fernando Chiba, pelos momentos diários, seja para uma discussão de metodologia seja para um momento de descontração.

Aos funcionários da FOA-UNESP, Márcia Castellani, Eliseide Navega, Patrick da Silva, Maurício Tutumi, Arnaldo Santos, Camilo Venâncio, João Correa, Jair Pires e Wilson de Souza, pela ajuda durante a realização deste trabalho. Agradeço, em especial a Márcia, que além de cuidar tão bem do nosso ambiente de trabalho se tornou uma amiga muito querida.

As funcionárias da seção de pós-graduação, Valéria Zagatto, Cristiane Lui e Lilian Mada por todo suporte durante estes anos.

Aos funcionários da biblioteca da FOA, Ana Claudia, Ana Paula, Maria Cláudia, Denise e Cláudio.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão parcial da bolsa de doutorado.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão parcial da bolsa de doutorado (Processo no. 2015/09373-0) e pela concessão do auxílio financeiro à pesquisa (Processo no. 2016/22180-9).

A UNESP (Universidade Estadual Paulista) pela oportunidade de poder realizar e concluir o Doutorado.

Aos meus pais, Marlei e Délcio, irmãos, Andressa e Dener, cunhados, Neto e Bruna, por terem sempre estado ao meu lado me apoiando e incentivando, e juntos fazerem o meu sonho se tornar realidade.

Ao meu noivo, Oscar Junior, por sempre incentivar e apoiar os meus sonhos mesmo sabendo que, para isso, seria necessário estar ausente em alguns momentos.

A minha família Antonini e Troiano, por todo apoio e suporte que me deram.

Aos meus amigos Fernanda Bernandi, Marcel Basso, Marina Módulo, Ariana Ferreira, Lais Silveira, Thais Fiorucci, Aymêe Taveres, Dayane Luzia, Jéssica Polato, Fernanda Demarqui, Amanda Gomes, Bruno Galina, Suelen Bonancim, Anderson Ferro e Tatiane Zambotti pela amizade e pela convivência de todos esses anos. Obrigada pelas boas vibrações e pela torcida.

Agradeço as demais pessoas que de alguma forma contribuíram e foram importantes durante esta minha caminhada.

***“Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece. Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano.”***

Osho

TROIANO, J. A. **Avaliação de mecanismos de modificação pós-traducional da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) associados a biodisponibilidade do óxido nítrico em artérias de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ao final da prenhez.** 2019. 115 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

## RESUMO

A redução da reatividade vascular à fenilefrina (PE) em aorta de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ao final da prenhez é dependente de maior produção e/ou maior biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), consequente do aumento da fosforilação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) via PI3K/Akt. A glicosilação do tipo N-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) é uma modificação pós-traducional que compete com a fosforilação pelos mesmos sítios de ligação nas proteínas. A O-GlcNAcilação da eNOS em serina<sup>1177</sup> leva a redução da sua atividade enquanto a fosforilação leva a sua ativação. Além destes mecanismos, a interação da eNOS com outras proteínas é capaz de regular positiva ou negativamente a sua atividade. O objetivo deste trabalho foi analisar possíveis alterações nos mecanismos de modificação pós-traducional que controlam a ativação da eNOS os quais poderiam contribuir para maior ativação e maior biodisponibilidade de NO observada em artérias de ratas prenhes. Foram avaliados o conteúdo proteico O-GlcNAc e também expressão das enzimas que participam desta modificação, O-GlcNAc transferase (OGT) e O-GlcNAcase (OGA) por Western Blotting e a atividade da OGA por ensaio bioquímico em aorta e em artéria mesentérica (2º ou 3º ramo) de ratas não prenhes (NP) e prenhes (P), normotensas (Wistar) e SHR. Ensaio de Western Blotting foram realizados também para análise da expressão das seguintes proteínas: Cav-1, p-Cav-1, CaM e Hsp90. Realizamos a contagem do número de cavéolas endoteliais da aorta e da artéria mesentérica na presença ou ausência da metil-β-ciclodextrina (dextrina, 10 mmol/L) por microscopia eletrônica. Em estudos funcionais, avaliamos a participação da enzima OGA, pela inibição com PugNAc (100 μmol/L) e das cavéolas, utilizando um desorganizador de cavéolas, a dextrina (10 ou 20 mmol/L), na menor reatividade vascular à PE observada em aortas de ratas P. Observamos que o conteúdo de proteínas O-GlcNAcizadas estava diminuído em aorta e em leito mesentérico de ratas Wistar P e SHR P. Apesar da expressão da OGT e da OGA não estar alterada, a atividade da OGA foi aumentada em aorta e leito mesentérico de ratas Wistar P, mas, encontra-se diminuída em aorta e aumentada em leito mesentérico de SHP P. A incubação com PugNAc reverteu a reduzida reatividade à PE em aorta e artéria mesentérica de ratas Wistar P mas este efeito não foi observado em vasos SHR P, demonstrando que a OGA parece ter um papel importante na redução da O-GlcNAcilação de proteínas vasculares em Wistar P. Em vasos incubados com PugNAc, a remoção do endotélio ou a incubação com L-NAME, não alterou significativamente a reatividade à PE. Juntos estes resultados

sugerem que a maior atividade da eNOS observada em vasos de Wistar P, fica prejudicada na presença do PugNAc, e depende da atividade da OGA. Como não houve alteração da resposta contrátil à PE em vasos de SHR P incubados com PugNAc, possivelmente um mecanismo diferente, envolvendo a menor atividade da OGT, ocorre nestas artérias para a redução da O-GlcNAcilação da eNOS. A desorganização das cavéolas por meio da dextrina causou aumento de contração à PE e redução de potência da ACh em aortas de Wistar NP e SHR NP, porém não houve alteração em aortas de ratas Wistar P e SHR P. A dextrina não alterou o número de cavéolas em artérias de Wistar P e SHR P quando comparado com ratas NP. SHR NP apresentam um reduzido número de cavéolas das aortas em relação a Wistar NP bem como expressão reduzida de Cav-1, p-Cav-1 e CaM. A prenhez não foi capaz de alterar a expressão da Cav-1, CaM e Hsp90 em aorta e leito mesentérico de ratas normotensas e hipertensas. Estes resultados sugerem que a prenhez não altera a expressão das proteínas Cav-1, CaM e Hsp90 e possivelmente a interação com a eNOS em aorta e artérias mesentéricas de ratas normotensas e hipertensas. Em conclusão, entre os mecanismos estudados de modificação pós-traducional da eNOS, a redução da O-GlcNAcilação da eNOS, por mecanismos que envolvem a atividade da OGA e possivelmente da OGT, favoreceria a fosforilação da eNOS e conseqüente maior biodisponibilidade de NO, contribuindo desta forma para modulação da resposta contrátil da PE nas artérias de ratas P.

**Palavras-chave:** Aorta. Artérias Mesentéricas. Óxido nítrico sintase endotelial. Calmodulina. Caveolina 1. Glicosilação. Hipertensão. Prenhez. Proteínas de Choque Térmico HSP90.



TROIANO, J. A. **Evaluation of post-translational modification mechanisms of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) associated with the nitric oxide bioavailability in arteries from spontaneously hypertensive rats (SHR) in the end of pregnancy.** 2019. 115 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

## ABSTRACT

Reduction of vascular reactivity to phenylephrine (PE) in aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR) at the end of pregnancy is dependent on higher production and/or higher bioavailability of nitric oxide (NO), as a consequence of increased endothelial nitric oxide synthase enzyme (eNOS) phosphorylation, by PI3K/Akt. Glycosylation with O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a post-translational modification that competes with phosphorylation by the same binding sites in proteins. O-GlcNAcylation of eNOS on serine site leads to a reduction in its activity while eNOS phosphorylation leads to its activation. In addition to these mechanisms, the interaction of eNOS with other proteins is able to regulate positively or negatively its activity. The objective of this study was to analyze possible changes in the mechanisms of post-translational modification that control the eNOS activation, which could contribute to its greater activation and greater bioavailability of NO observed in arteries of pregnant rats. The O-GlcNAc-protein content and also the enzymes expression that participate in this modification, O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA) was assessed by Western Blotting, and OGA activity were evaluated by biochemical assay in the aorta and in the artery mesenteric (2<sup>nd</sup> or 3<sup>rd</sup> branch) of non-pregnant (NP) and pregnant (P), normotensive rats (Wistar) and SHR. Western Blotting assays were also performed for expression analysis of the following proteins: Cav-1, p-Cav-1, CaM and Hsp90. We performed the counting of the number of endothelial caveolae in the aorta and the mesenteric artery in the presence or absence of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (dextrin, 10 mmol/L) by electronic microscopy. In functional studies, we evaluated the participation of the OGA enzyme, by inhibition with PugNAc (100  $\mu$ mol/L) and of the caveolae, using a caveolae disassembler, dextrin (10 or 20 mmol/L), in the reduced vascular reactivity observed in aortas or mesenteric arteries of P rats. We observed that the content of O-GlcNAcylated proteins was decreased in the aorta and in the mesenteric bed of Wistar P and SHR P rats. Although OGT and OGA expression is not altered, OGA activity was increased in the aorta and mesenteric bed of Wistar P rats but was decreased in the aorta and increased in the mesenteric bed of SHP P. Incubation with PugNAc reversed the reduced reactivity to PE in the aorta and mesenteric artery of Wistar P but this effect was not observed in SHR P arteries, demonstrating that OGA appears to play an important role in reducing O-GlcNAcylation of vascular proteins in Wistar P. In arteries incubated with PugNAc, endothelial removal or incubation with L-NAME did not significantly alter reactivity to PE. Together, these

results suggest that the greater eNOS activity observed in Wistar P vessels was impaired in the presence of PugNAc, and it depends on OGA activity. As there was no change in the contractile response to PE in SHR P arteries incubated with PugNAc, possibly a different mechanism, involving the lower activity of OGT, occurs in these vessels for the reduction of O-GlcNAcylation of eNOS. Dextrin caused increased contraction of PE and decreased ACh potency in Wistar NP and SHR NP aortas, but there was no change in aortas of Wistar P and SHR P. Dextrin did not alter the number of caveolae in Wistar P and SHR P arteries compared to NP rats. SHR NP showed a lower number of caveolae than to NP Wistar as well reduced expression of Cav-1 and CaM. Pregnancy was not able to alter the expression of Cav-1, CaM and Hsp90 in the aorta and mesenteric bed of normotensive and hypertensive rats. These results suggest that pregnancy does not alter the expression of Cav-1, CaM and Hsp90 proteins and possibly interaction with eNOS in the aorta and mesenteric arteries of normotensive and hypertensive rats. In conclusion, among the studied mechanisms of post-translational modification of eNOS, the reduction of O-GlcNAcylation of eNOS, by mechanisms that involve OGA activity and possibly OGT, would favor eNOS phosphorylation and consequent greater NO bioavailability, contributing in this way for modulation of the contractile response to PE in the arteries of P rats.

**Keywords:** Aorta. Calmodulin. Caveolin 1. Endothelial Nitric Oxide Synthase. Glycosylation. HSP90 Heat-Shock Proteins. Hypertension. Mesenteric Arteries. Pregnancy, animal.

## ABREVIATURAS

2K-1C – ratos hipertensos renovasculares dois rins, um clip (do inglês, *two-kidney, one-clip*)

$\alpha$  – alfa

$\beta$  – beta

% – porcentagem

°C – graus Celsius

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{L}$  – microlitro

$\mu\text{m}$  – micrômetro

$\mu\text{mol/L}$  – micromol por litro

ACh – acetilcolina, clorato de acetilcolina

Akt – proteína quinase B

BSA – albumina de soro bovino (do inglês, *bovine serum albumin*)

$\text{Ca}^{2+}$  – cálcio

$\text{CaCl}_2$  – cloreto de cálcio

CaM – calmodulina

Cav-1 – caveolina-1

$\text{CO}_2$  – dióxido de carbono

Co-IP – Co-Imunoprecipitação

DMEM – meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DOCA – acetato de deoxicorticosterona

E<sup>-</sup> – ausência de endotélio

E<sup>+</sup> – presença de endotélio

EC<sub>50</sub> – concentração necessária para 50 % do efeito máximo

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

E<sub>max</sub> – efeito máximo

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial ou isoforma III (do inglês, *endothelial nitric oxide synthase*)

EPM – erro padrão da média

ERO – espécies reativas de oxigênio  
g – grama  
GlcNAc – N-acetil-glucosamina  
Hsp90 – proteína de choque térmico 90 (do inglês, *heat shock protein 90*)  
HUVEC – células endoteliais de veia umbilical humana (do inglês, *human umbilical vein endothelial cells*)  
IC – circunferência interna  
IF – intensidade de fluorescência  
iNOS – óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*)  
KCl – cloreto de potássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato de potássio monohidratado  
KO – nocaute (do inglês, *knock out*)  
L – litro  
L-NAME – L-N<sup>G</sup>-nitroarginina metil éster  
mg – miligrama  
MgSO<sub>4</sub> – sulfato de magnésio  
mL – mililitro  
mm – milímetro  
mmHg – milímetros de mercúrio  
mmol/L – milimol por litro  
mN – miliNewton  
mol/L – mol por litro  
NaCl – cloreto de sódio  
NaHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de sódio  
nm – nanômetro  
nmol/L – nanomol por litro  
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal (do inglês, *neuronal nitric oxide synthase*)  
NO – óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)  
NOS – óxido nítrico sintase (do inglês, *nitric oxide synthase*)  
NOX – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase não fagocítica  
NP – ratas não prenhes  
NP-40 – nonidet P-40

O<sub>2</sub><sup>-</sup> – ânion superóxido

O<sub>2</sub> – oxigênio molecular

OGA – O-GlcNAcase

O-GlcNAc – Glicosilação com *N*-acetil-glucosamina

OGT – O-GlcNAc transferase

ONOO<sup>-</sup> – peróxido de nitrito

OsO<sub>4</sub> – tetróxido de ósmio

P – ratas prenhes

pD<sub>2</sub> – logaritmo negativo da EC<sub>50</sub>

PE – fenilefrina, cloridrato de L- fenilefrina

pH – potencial hidrogeniônico

PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase

RIPA – tampão para ensaio de imunoprecipitação

rpm – rotações por minuto

Ser – serina

Src – proteína tirosina quinase Src

SHR – ratos espontaneamente hipertensos (do inglês, *spontaneously hypertensive rats*)

TBS-T – tampão tris-salina acrescido de Tween 20

Tyr –tirosina (do inglês, *tyrosine*)

UA – unidades arbitrárias

UDP- GlcNAc – difosfato de uridina *N*-acetilglucosamina

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, *vascular endothelial growth factor*)

WKY – ratos Wistar Kyoto

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens das bandas e quantificação da expressão de proteínas O-GlcNAc/  $\beta$ -actina em homogenatos de aorta de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 6) dos diferentes grupos. & p = 0,0001 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* SHR não prenhes; \*\*\* p < 0,001 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* Wistar prenhes e \*\* p < 0,01 entre os grupos SHR não prenhes *versus* SHR prenhes (ANOVA).

57

Figura 2 - Imagens das bandas e quantificação da expressão de proteínas O-GlcNAc/  $\beta$ -actina em homogenatos de leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico (n = 6) dos diferentes grupos. \* p < 0,05 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* Wistar prenhes ou SHR não prenhes *versus* SHR prenhes (ANOVA).

59

Figura 3 - Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica de A) OGT/  $\beta$ -actina e B) OGA/  $\beta$ -actina em homogenatos de aorta de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 6) dos diferentes grupos. \* p < 0,05 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* SHR não prenhes (ANOVA).

60

Figura 4 - Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica de A) OGT/  $\beta$ -actina e B) OGA/  $\beta$ -actina em homogenatos de leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico (n = 6) dos diferentes grupos

(ANOVA).

61

Figura 5 - Atividade da enzima O-GlcNAcase (OGA), em intensidade de fluorescência, em homogenatos de aorta de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 6) dos diferentes grupos. & p < 0,0001 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* SHR não prenhes, \* p < 0,05 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* Wistar prenhes ou SHR não prenhes *versus* SHR prenhes (ANOVA).

62

Figura 6 - Atividade da enzima O-GlcNAcase (OGA), em intensidade de fluorescência, em homogenatos de leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico (n = 5-6) dos diferentes grupos. & p < 0,05 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* SHR não prenhes, \* p < 0,05 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* Wistar prenhes ou SHR não prenhes *versus* SHR prenhes (ANOVA).

63

Figura 7 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio incubados com veículo ou PugNAc por 24 horas (anéis incubados), de Wistar não prenhes (NP, em A) ou prenhes (P, em B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 6). \*\* p < 0,01 valores de Emax P PugNAc *versus* P Veículo, & p < 0,05 valores de pD<sub>2</sub> P Veículo *versus* P PugNAc (Test t de Student).

64

Figura 8 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio incubados com veículo ou PugNAc por 24 horas, de Wistar não prenhes (NP, em A) ou prenhes (P, em B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos

realizados (n = 6). \*\* p < 0,01 valores de Emax P Veículo *versus* P PugNAc (Teste t de Student).

65

Figura 9 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas com endotélio (E+, quadrado preto), sem endotélio (E-, quadrado branco) ou incubados com L-NAME (100 µmol/L, círculo fechado) de Wistar prenhes, incubados com veículo (A) ou PugNAc (B) por 24 horas em DMEM. Os pontos representam a média ± EPM dos experimentos realizados (n = 6-7). \*\*\* p < 0,001 valores de Emax P Veículo E+ *versus* demais P Veículo. \* p < 0,05 valores de Emax P PugNAc E+ *versus* P PugNAc L-NAME, & p < 0,01 valores de pD<sub>2</sub> P PugNAc E+ *versus* P PugNAc E- e P PugNAc L-NAME (ANOVA).

67

Figura 10 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de artérias mesentéricas com endotélio (E+, quadrado fechado), sem endotélio (E-, quadrado aberto) ou incubados com L-NAME (100 µmol/L, círculo fechado) de Wistar prenhes, incubados com veículo (A) ou PugNAc (B) por 24 horas em DMEM. Os pontos representam a média ± EPM dos experimentos realizados (n= 6-7). \* p < 0,05 valores de Emax P Veículo E+ *versus* demais P Veículo E- e P Veículo L-NAME. # p < 0,05 valores de Emax P PugNAc E+ *versus* P PugNAc L-NAME (ANOVA).

68

Figura 11 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio, incubados com veículo ou PugNAc por 24 horas (anéis incubados), de SHR não prenhes (NP, em A) ou prenhes (P, em B). Os pontos representam a média ± EPM dos experimentos realizados (n = 5-6).

70

Figura 12 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de artéria mesentérica com endotélio, incubados com veículo ou PugNAc por 24 horas (anéis incubados) de SHR não



prenhes (NP, em A) ou prenhes (P, em B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 5-6). 71

Figura 13 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas de ratas Wistar (A) não prenhes (NP) e (B) prenhes (P) na ausência ou na presença de Dextrina (10 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos (n = 5). \*\* p < 0,01 Emax NP *versus* NP + Dextrina, & p < 0,05 pD<sub>2</sub> NP *versus* NP + Dextrina (Teste t de Student). 73

Figura 14 - Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas de ratas Wistar não prenhes (NP, em A) e prenhes (P, em B) na ausência ou na presença de Dextrina (10 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos (n = 5). & p < 0,05 pD<sub>2</sub> NP *versus* NP + Dextrina (Teste t de Student). 74

Figura 15 - Curvas concentração-efeito (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) para fenilefrina (PE, em A) e acetilcolina (ACh, em B) em anéis de aortas de ratas Wistar prenhes (P) na ausência ou na presença de Dextrina (20 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos (n = 5). \*\* p < 0,01 Emax P *versus* P + Dextrina; & p < 0,01 pD<sub>2</sub> P *versus* P + Dextrina (Teste t de Student). 76

Figura 16 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas de SHR não prenhes (NP, em A) e prenhes (P, em B) na ausência ou na presença de Dextrina (10 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos (n = 5). \*\* p < 0,01 pD<sub>2</sub> NP *versus* NP + Dextrina (Teste t de Student). 78

Figura 17 - Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas de SHR não prenhes (NP, em

A) e prenhes (P, em B) na ausência ou na presença de Dextrina (10 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos (n = 5). & p < 0,01 pD<sub>2</sub> NP *versus* NP + Dextrina (Teste t de Student). 79

Figura 18 - Curvas concentração-efeito (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) para fenilefrina (PE, em A) e acetilcolina (ACh, em B) em anéis de aortas de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) prenhes (P) na ausência ou na presença de Dextrina (20 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos (n = 5). \*\* p < 0,05 Emax P *versus* P + Dextrina; & p < 0,05 pD<sub>2</sub> P *versus* P + Dextrina (Teste t de Student). 80

Figura 19 - Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/ $\mu\text{m}^2$  em aorta de ratas Wistar e ratas espontaneamente hipertensas (SHR), não prenhes (NP, barras brancas) e prenhes (P, barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \* p < 0,05 entre Wistar NP *versus* demais grupos (ANOVA). 82

Figura 20 - Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/ $\mu\text{m}^2$  em aorta de ratas Wistar não prenhes (NP) e prenhes (P) na ausência (barras brancas) ou na presença (barras pretas) da dextrina (10 mmol/L). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \* p < 0,05 entre Wistar NP *versus* demais grupos (ANOVA). 83

Figura 21 - Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/ $\mu\text{m}^2$  em aorta de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) não prenhes (NP) e prenhes (P) na ausência (barras brancas) ou na presença (barras pretas) da dextrina (10 mmol/L). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 5) dos diferentes grupos. \* p < 0,05 entre Wistar NP *versus* Wistar NP + Dextrina (ANOVA). 84

Figura 22 – Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/ $\mu\text{m}^2$  em artéria mesentérica de ratas Wistar e ratas espontaneamente hipertensas (SHR), não prenhes (NP) e prenhes (P). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 5) dos diferentes grupos. \*\* p < 0,01 entre Wistar NP e P *versus* SHR NP e P (ANOVA).

86

Figura 23 – Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/ $\mu\text{m}^2$  em artéria mesentérica de ratas Wistar não prenhes (NP) e prenhes (P) na ausência ou na presença de dextrina (10 mmol/L). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \* p < 0,05 entre Wistar NP *versus* Wistar NP + Dextrina (ANOVA).

87

Figura 24 – Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/ $\mu\text{m}^2$  em artéria mesentérica de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) não prenhes (NP) e prenhes (P) na ausência ou presença de dextrina (10 mmol/L). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em artéria mesentérica (n = 5) dos diferentes grupos. \* p < 0,05 entre Wistar NP *versus* Wistar NP + Dextrina (ANOVA).

88

Figura 25 – Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica da caveolina-1 (Cav-1)/  $\beta$ -actina (A) e p-Cav-1Tyr14/Cav-1 (B) em homogenatos de aorta de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 5) dos diferentes grupos. \* p < 0,05 SHR NP *versus* Wistar NP e P (ANOVA).

90

Figura 26 – Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica

da caveolina-1 (Cav-1)/  $\beta$ -actina (A) e p-Cav-1Tyr14/Cav-1 (B) em homogenatos de leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico (n = 5) dos diferentes grupos.

90

Figura 27 – Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica da calmodulina (CaM)/  $\beta$ -actina em homogenatos de aorta (em A) e de leito mesentérico (em B) de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico (n = 5) dos diferentes grupos. \* p < 0,05 SHR NP *versus* Wistar NP (ANOVA).

91

Figura 28 - Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica da Hsp90/  $\beta$ -actina em homogenatos de aorta (em A) e de leito mesentérico (em B) de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico (n = 5-6) dos diferentes grupos.

92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluição dos anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos de Western Blotting.	46
---	----

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	32
1.1 O-GlcNAcilação da eNOS.....	34
2.2 Interações proteína-proteína que regulam a eNOS .....	36
2 HIPÓTESE .....	40
3 OBJETIVOS .....	41
3.1 Objetivo geral .....	42
3.2 Objetivos específicos .....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Animais .....	44
4.2 Western blotting .....	44
4.3 Atividade da O-GlcNAcase (OGA) .....	46
4.4 Reatividade vascular .....	47
4.4.1 Reatividade vascular em artéria de condutância (artéria aorta).....	47
4.4.2 Reatividade vascular em artéria de resistência (artéria mesentérica).....	47
4.4.3 Efeito do PugNAc na reatividade vascular à fenilefrina (PE) em anéis de aortas e artérias mesentéricas de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes....	49
4.4.4 Efeito da metil- $\beta$ -cliclodextrina (dextrina) na reatividade vascular à fenilefrina (PE) e à acetilcolina (ACh) em anéis de aortas de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes .....	49
4.5 Microscopia Eletrônica .....	50
4.6 Análise estatística .....	52
4.7 Drogas e Reagentes .....	53
5 RESULTADOS .....	56
5.1 Conteúdo da O-GlcNAcilação das proteínas em aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes.....	56
5.2 Expressão da enzima OGT e OGA em homogenatos de aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes .....	60
5.3 Atividade da O-GlcNAcase (OGA) em homogenatos de aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes .....	61

5.4 Efeito do PugNAc na reatividade vascular à fenilefrina (PE) em aorta e artéria mesentérica de ratas Wistar não prenhes e prenhes.....	63
5.4 Efeito do PugNAc na reatividade vascular à fenilefrina (PE) em aorta e artéria mesentérica de SHR não prenhes e prenhes .....	69
5.5 Efeito da metil- $\beta$ -ciclodextrina (dextrina) na reatividade vascular à fenilefrina (PE) e à acetilcolina (ACh) em aorta de ratas Wistar não prenhes e prenhes .....	72
5.6 Efeito da metil- $\beta$ -ciclodextrina (dextrina) na reatividade vascular à fenilefrina (PE) e à acetilcolina (ACh) em aorta de SHR não prenhes e prenhes.....	77
5.7 Quantificação de cavéolas endoteliais em aortas de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes .....	80
5.8 Quantificação de cavéolas endoteliais em artéria mesentérica de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes.....	85
Observamos que artérias mesentéricas de ratas hipertensas não prenhes ou prenhes apresentam menor número de cavéolas endoteliais se comparadas as artérias mesentéricas de ratas normotensas não prenhes e prenhes, respectivamente (Figura 22). .....	85
5.9 Expressão da caveolina-1 (Cav-1) e da fração fosforilada da Cav-1 <sup>Tyr14</sup> (p-Cav-1 <sup>Tyr14</sup> ) em aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes .....	89
5.10 Expressão da calmodulina (CaM) em aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes.....	91
5.11 Expressão da Hsp90 em aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes .....	92
6 DISCUSSÃO .....	93
7 CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXOS .....	115

# ***INTRODUÇÃO***



## 1 INTRODUÇÃO

As doenças hipertensivas associadas à gravidez continuam sendo as principais causas de morte materna e neonatal, das alterações no desenvolvimento do sistema cardiovascular, imunológico, neurológico e do funcionamento cognitivo da prole (PINHEIRO *et al.*, 2016). Como ainda não foram descobertas as suas causas principais, e/ou um tratamento efetivo para estas doenças, o conhecimento das alterações fisiopatológicas associadas à gravidez, pode fornecer informações úteis para compreensão dos mecanismos vasculares envolvidos nas doenças hipertensivas associadas à gravidez, assim como de novos alvos para terapias alternativas e mais eficazes.

Alterações hemodinâmicas ocorridas na gravidez, como o aumento do volume plasmático e do débito cardíaco levam às adaptações vasculares. Estas adaptações, como a vasodilatação das artérias uterinas e diminuição da resistência vascular periférica, são necessárias e levam a diminuição fisiológica dos valores de pressão arterial em mulheres grávidas e em ratas normotensas e hipertensas prenhes (BALLEJO *et al.*, 2002; COELHO; BALLEJO; SALGADO, 1997; STENNET; KHALIL, 2006; TROIANO *et al.*, 2016; ZANCHETA *et al.*, 2015). Em associação à redução da pressão arterial observada ao final da prenhez em ratas, há redução importante da resposta contrátil de vasos sanguíneos de resistência (2º e 3º ramos de artérias do leito mesentérico) e de condutância (artéria aorta) a estímulo de vasoconstritores como fenilefrina, angiotensina II, noradrenalina e vasopressina (ALOAMAKA *et al.*, 1993; BALLEJO *et al.*, 2002; CHU; BEILIN, 1993a, 1993b; MASSICOTTE *et al.*, 1987; NATHAN; CUEVAS CHAUDHURI, 1995; PALLER, 1984; RAVELIC; BURNSTOCK, 1996; TROIANO *et al.*, 2016; ZANCHETA *et al.*, 2015).

As alterações vasculares associadas à prenhez são mediadas principalmente pelo óxido nítrico (NO), um fator relaxante derivado do endotélio vascular, que participa continuamente da regulação do tônus vascular e da manutenção do fluxo sanguíneo (UMANS; LEVI, 1995). A enzima NO sintase (NOS) é capaz de sintetizar NO e possui três isoformas: a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS), sendo a eNOS a mais abundante em vasos sanguíneos (FÖRSTEMANN; BOISSEL; KLEINERT, 1998; KNOWLES; MONCADA, 1994;

MONCADA; PALMER; HIGGS, 1988). Nas células endoteliais a eNOS está localizada principalmente nas cavéolas (invaginações da membrana plasmática) e no complexo de Golgi (SESSA *et al.*, 1995; SHAUL *et al.*, 1996).

A eNOS é ativada por estímulos fisiológicos ou farmacológicos (como por exemplo a acetilcolina), os quais aumentam a concentração intracelular de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e levam a formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CaM) ativando assim a enzima. A eNOS também pode ser ativada pelo *shear stress* (ou estresse de cisalhamento) ou pela contração vascular (SILVA *et al.*, 2014), por uma via menos dependente de cálcio, mas dependente da atividade de enzimas quinases fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase B (Akt). Quando ativada, a via PI3K/Akt fosforila a eNOS em resíduos de Serina 1177 (Ser<sup>1177</sup>) ativando-a e consequentemente levando a síntese de NO (AYAJIKI *et al.*, 1996; CORSON *et al.*, 1996; FLEMING *et al.*, 1998; FULTON *et al.*, 1999).

Estudos prévios de nosso grupo (ZANCHETA *et al.*, 2015) mostraram que a expressão das proteínas, em suas formas fosforiladas PI3K, Akt e eNOS<sup>Ser1177</sup> está aumentada em homogenatos de aortas de ratas prenhes normotensas (Wistar) e ratas espontaneamente hipertensas (SHR) quando comparadas com aortas de ratas não prenhes das respectivas linhagens. O aumento da expressão destas proteínas é acompanhado de um aumento na concentração de NO em células endoteliais de aortas de ratas prenhes Wistar e SHR. Ainda, o Wortmannin, um inibidor da via PI3K/Akt, foi capaz de reverter a menor reatividade de aortas à fenilefrina (PE) observada no final da prenhez em ratas Wistar e SHR, sugerindo assim que a via PI3K/Akt/eNOS estaria mais ativa e envolvida na modulação endotelial da reatividade de aortas à PE. Estes resultados sugerem que a prenhez seria uma condição fisiológica favorável à redução da pressão arterial principalmente em SHR, levando ao aumento da produção e maior biodisponibilidade de NO que contribuiria para menor reatividade vascular à estimulação  $\alpha$ -adrenérgica e consequente redução da resistência vascular periférica durante este período.

Posteriormente, estudos de nosso grupo (TROIANO *et al.*, 2016) mostraram que o dano oxidativo em aortas e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células endoteliais estão reduzidos em SHR prenhes quando comparados a SHR não prenhes. O complexo enzimático NAD(P)H oxidase (também conhecido

por NOX) é a maior fonte de geração de ERO vascular (GEISZT, 2006) e tem como principal produto o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) que pode reagir com o NO e formar o peróxido de nitrito ( $ONOO^-$ ), reduzindo assim a biodisponibilidade de NO (SARAN; MICHEL; BORS, 1990). Utilizamos a apocinina, um inibidor de NOX, em nossos estudos funcionais e não observamos mais diferenças significativas na reatividade à PE entre aortas de SHR prenhes e SHR não prenhes, confirmando uma menor geração de ERO em vasos de SHR prenhes. Esta sugestão foi reforçada pelos resultados que demonstraram que a expressão das subunidades NOX1, NOX2 e NOX4, e a produção de ERO dependente de NOX estão diminuídas em aortas de SHR prenhes, sugerindo que a prenhez reduz a atividade do complexo enzimático NAD(P)H oxidase em aorta de SHR prenhes. Resumidamente, estes resultados obtidos por nosso laboratório sugerem que a prenhez está associada a maior atividade da via PI3K-Akt-eNOS, maior produção de NO em aorta de ratas normotensas e hipertensas e menor produção de ERO mediada pela redução de atividade de NOX1, NOX2 e NOX4 em aortas de ratas hipertensas. Estas alterações contribuem para maior biodisponibilidade de NO e modulação endotélio-eNOS dependente sobre a reatividade de aortas à PE.

A partir destas observações, nós propusemos investigar possíveis alterações de mecanismos de modificação pós-traducional que ocorrem na eNOS e que estariam relacionados diretamente com a produção/biodisponibilidade de NO em vasos sanguíneos de SHR prenhes. Analisamos especificamente os seguintes mecanismos:

### **1.1 O-GlcNAcilação da eNOS**

A ligação do tipo O-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (O-GlcNAcilação ou O-GlcNAc) é uma modificação pós-traducional reversível em sítios específicos de serinas e treoninas de proteínas nucleares e citoplasmáticas (HART *et al.*, 1989; TORRES; HART, 1984; WELLS; VOSSELLER; HART, 2001). Esta ligação é dependente do produto final da via de biossíntese da hexosamina, o UDP-GlcNAc, pois esta ligação se dá com seu grupamento *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc), um

monossacarídeo, que se liga ao oxigênio da hidroxila de proteínas (HANOVER; KRAUSE; LOVE, 2010; MARSHALL; BACOTE; TRAXINGER, 1991).

Os níveis de O-GlcNAcilação são regulados por duas enzimas: a O-GlcNAc transferase (OGT) responsável pela ligação catalítica do carboidrato GlcNAc com a proteína alvo e a O-GlcNAcase (OGA) responsável pela remoção hidrolítica desta ligação (HART; HOUSLEY; SLAWSON, 2007; WELLS *et al.*, 2002). Assim, o bloqueio farmacológico da OGA tem sido utilizado para análise dos efeitos de O-GlcNAcilação, uma vez que sua inibição promove um aumento de proteínas O-GlcNAciladas (NGOH *et al.*, 2010).

Já foi demonstrado que resíduos de serina<sup>1177</sup> da eNOS pode ser alvo da O-GlcNAcilação (DU *et al.*, 2001) e que interessantemente esta ligação compete pelos mesmos sítios de ligação (serina e treonina) de outra modificação pós-traducional da proteína, a fosforilação. A fosforilação por sua vez, é a ligação de um grupamento fosfato (PO<sub>4</sub>) nos aminoácidos serina, treonina e tirosina (em células eucariontes) da proteína alvo por meio de proteínas quinases e esta modificação é a mais comum e uma das mais importantes envolvidas na regulação da ativação e/ ou desativação de proteínas (FISCHER; KREBS, 1955; OLSEN *et al.*, 2006). Com isso, uma vez que a eNOS está O-GlcNAcilada ela não poderá ser fosforilada e *vice-versa*. Portanto a O-GlcNAcilação em Ser<sup>1177</sup> é um mecanismo que regula negativamente a atividade da eNOS, pois em níveis aumentados, leva a uma redução da fosforilação neste resíduo da enzima e conseqüente redução na síntese de NO (DU *et al.*, 2001; ZEIDAN; HART, 2010). Tem sido sugerido que a O-GlcNAcilação de proteínas estaria associado a várias doenças, como, por exemplo, a hipertensão.

Estudos já demonstraram que o aumento da concentração de glicose, o que leva a um conseqüente aumento na via de biossíntese da hexosamina, está relacionado com o aumento da O-GlcNAcilação das proteínas vasculares. Este aumento é capaz de reduzir a atividade da eNOS, a sua expressão fosforilada em Ser<sup>1177</sup>, aumentar a O-GlcNAcilação da eNOS em células endoteliais bovina e também aumentar a O-GlcNAcilação da eNOS seguida de uma redução da fosforilação da eNOS<sup>Ser1177</sup> em aorta de ratos diabéticos (DU *et al.*, 2001). Kim *et al.* (2011) mostraram que o aumento da O-GlcNAcilação das proteínas, por meio do tratamento prévio com glucosamina, foi capaz de aumentar a contração induzida por U46619 (análogo do

tromboxano A2), mas não por PE, em aorta sem endotélio de ratos normotensos. Ainda, arteríolas do músculo grácil de ratos Wistar tiveram seu relaxamento induzido por histamina prejudicado devido ao aumento da O-GlcNAcilação acompanhada de redução da fosforilação da eNOS<sup>Ser1177</sup> (BELEZNAI; BAI, 2012).

Lima *et al.* (2008) demonstraram que a incubação de aorta de ratos Sprague-Dawley com PugNAc, um inibidor da enzima OGA, aumentou a expressão de proteínas O-GlcNAciladas e a resposta contrátil da aorta à PE e à serotonina. Este aumento da contração não foi observado quando as curvas concentração-efeito de PE em aortas incubadas com PugNAc foram comparadas com as curvas obtidas na presença de L-NAME (inibidor da NOS) ou que tiveram o endotélio removido mecanicamente. Observaram também que o aumento da O-GlcNAcilação reduziu o efeito vasodilatador da acetilcolina (ACh) e da atividade da eNOS, ao reduzir a fosforilação da eNOS<sup>Ser1177</sup> e da Akt<sup>Ser473</sup>. Estes achados demonstraram que o aumento da O-GlcNAcilação poderia prejudicar a função vascular e endotelial devido a menor atividade da via PI3K/Akt/eNOS e consequente redução da biodisponibilidade de NO. Lima *et al.* (2009) mostraram também que a quantidade de proteínas O-GlcNAciladas estava aumentada em aortas e em artérias de resistência de ratos hipertensos DOCA-salt e sugeriram que neste modelo de hipertensão, um desequilíbrio entre as formas fosforiladas e O-GlcNAciladas da eNOS levaria a alterações na produção de NO.

Como ainda não foi avaliada a participação desta via na modulação endotelial da reatividade vascular a agonistas vasoconstritores associada à prenhez, levantamos a hipótese de que ao final da prenhez de ratas normotensas ou hipertensas, o aumento da produção de NO pela fosforilação da eNOS em resíduo de Ser<sup>1177</sup> via PI3K/Akt/eNOS seria dependente da redução da O-GlcNAcilação da eNOS e a OGA participaria da aumentada modulação endotélio-eNOS dependente da contração vascular à PE em aortas e artérias mesentéricas de ratas prenhes.

## **2.2 Interações proteína-proteína que regulam a eNOS**

A eNOS pode interagir com diferentes proteínas, sendo negativamente regulada pela caveolina-1 (Cav-1) (FERON *et al.*, 1996) e positivamente regulada

pela calmodulina (CaM) (FÖRSTERMANN *et al.*, 1991) e pela proteína *heat shock* 90 (Hsp90) (GARCIA-GARDEÑA *et al.*, 1998).

As cavéolas são invaginações na membrana plasmática de algumas células, como as endoteliais, e são compostas principalmente por colesterol, esfingolipídios e proteínas, dentre elas a caveolina (Cav) (SEVER, 1981; YAO *et al.*, 2009).

As Cav são proteínas estruturais das cavéolas e em mamíferos, elas estão presentes em 3 diferentes isoformas: Cav-1, Cav-2 e Cav-3 (OKAMOTO *et al.*, 1998; SHAUL; ANDERSON, 1998). Além da sua função estrutural determinante nas cavéolas, tem sido sugerido um papel importante da Cav-1 em algumas vias de sinalização (PATEL; MURRAY; INSEL, 2008; RAZANI; LISANTI, 2001) e na interação direta com a eNOS, modulando-a negativamente, pois quando interagem, a eNOS se mantém inativa (GARCIA-GARDEÑA *et al.*, 1996; JU *et al.*, 1997). Por outro lado, camundongos Cav-1 KO tiveram redução significativa da fosforilação da eNOS<sup>Ser1177</sup> em artérias carótidas (YU *et al.*, 2006) demonstrando que apesar da Cav-1 inibir a enzima, a específica localização da eNOS na cavéola é necessária para a sua ativação (BUSCONI; MICHEL, 1993; GOVERS *et al.*, 2002), uma vez que a Cav-1 tem como função estabilizar e prevenir a degradação da eNOS (CHEN *et al.*, 2018). Estes estudos demonstram o efeito paradoxal que a Cav-1 desempenha sobre a atividade da eNOS (SONVEAUX *et al.*, 2004).

A CaM é uma proteína que ao se ligar a quatro íons  $Ca^{2+}$ , tem sua conformação alterada e desta maneira, consegue se ligar a outras proteínas, como a eNOS, e regular suas atividades, levando a ativação destas proteínas (PARK *et al.*, 2008). Quando ocorre o aumento da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  nas células endoteliais, há um aumento da afinidade entre a CaM e eNOS que desloca a Cav-1, uma vez que CaM e Cav-1 competem pelo mesmo sítio ativo da enzima (FERON *et al.*, 1998; MICHEL *et al.*, 1997). A CaM promove o alinhamento de ambos os domínios redutase e oxigenase da eNOS, transferência de elétrons entre estas subunidades monoméricas e conseqüentemente ativação da enzima e síntese de NO (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Estudos sugerem que expressão da Cav-1, bem como da CaM, estão diminuídas em aortas com o endotélio preservado de SHR quando comparados com ratos Wistar Kyoto (WKY) (CRISTOFARO; YALLA; SULLIVAN, 2012; PIECH *et al.*,

2003; SANCHÉZ *et al.*, 2006; VERA *et al.*, 2007). Ainda, a perda ou a redução da Cav-1 levaria a desregulação da atividade da eNOS e subsequente remodelação vascular associada a hipertensão (WUNDERLICH *et al.*, 2008; ZHAO; MALIK, 2009; ZHAO *et al.*, 2009). Juntos, estes dados sugerem que a menor expressão de Cav-1 e CaM contribuiria para menor atividade de eNOS em aortas de SHR. Não há estudos sobre possíveis alterações na interação ou na expressão dessas proteínas em vasos sanguíneos de ratas hipertensas prenhes que justificassem a maior atividade da eNOS.

A proteína de choque térmico 90 (Hsp90) é classificada como uma proteína chaperona e está presente em células eucariontes. A associação da Hsp90 com outras proteínas leva a regulação de vias de sinalização celular (PEARL; PRODROMOU, 2006). Foi demonstrado que o recrutamento de Hsp90 pelo fator de crescimento endotelial (VEGF), histamina e *shear stress* ativa a eNOS e conseqüentemente há maior produção de NO pela enzima (GARCIA-CARDEÑA *et al.*, 1998; RUSSELL *et al.*, 2000). A ativação da eNOS pela proteína Hsp90 leva ao relaxamento endotélio-dependente em vasos sanguíneos (GARCIA-CARDEÑA *et al.*, 1998). Já a inibição da ligação de Hsp90 na eNOS reduz a produção de NO pela eNOS (SHAH *et al.*, 1999). Além disto, Hps90 parece aumentar a afinidade da CaM com a eNOS e a dissociação entre eNOS e Cav-1 (SESSA, 2004; TAKAHASHI; MENDELSON, 2003). Ling *et al.* (2016) demonstraram que a relação Hsp90/eNOS fosforilada está diminuída em aortas de SHR quando comparados com ratos WKY. Estudos ainda não demonstraram se a proteína Hsp90 estaria envolvida no aumento do NO dependente da eNOS observada no final da prenhez de ratas normotensas e hipertensas.

***HIPÓTESE***



## **2 HIPÓTESE**

A redução da O-GlcNAcilação das proteínas vasculares, como a eNOS, e o aumento da expressão das proteínas Caveolina-1, Hsp90 e Calmodulina levariam a maior biodisponibilidade de NO em aortas e artérias mesentéricas de SHR prenhes.

# ***OBJETIVOS***

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a modificação pós-traducional de O-GlcNAcilação, bem como a expressão de proteínas que interagem com a eNOS: caveolina-1, calmodulina e Hsp90 em aortas e artérias mesentéricas de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) no final da prenhez.

#### **3.2 Objetivos específicos**

a) Verificar se a prenhez altera a expressão da O-GlcNAcilação das proteínas totais bem como de enzimas que regulam esta modificação, OGT e OGA, em aorta e artéria mesentérica de SHR;

b) Verificar se a prenhez altera a expressão da O-GlcNAcilação de proteínas vasculares, entre estas a eNOS, em aortas e artérias mesentéricas de SHR;

c) Verificar se a prenhez altera o número de cavéolas em aortas e artérias mesentéricas de SHR;

d) Verificar se a prenhez altera a expressão de proteínas Cav-1, CaM e Hsp90, as quais interagem e contribuem para a fosforilação da eNOS em aortas e artérias mesentéricas de SHR.

# ***MATERIAL E MÉTODOS***

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, CEUA-FOA/UNESP protocolo nº 2015-00730 (Anexo A).

### 4.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (aproximadamente 220 g), como controle normotenso e ratas espontaneamente hipertensas (SHR, aproximadamente 180 g) com 12 semanas de vida. Ambas as linhagens foram divididas em dois grupos: ratas não prenhes (NP) e ratas prenhes (P). As ratas não prenhes foram utilizadas nos experimentos na fase estro do ciclo estral e as ratas prenhes, no período final da prenhez, entre 18º ao 20º dia. Para o acasalamento, um rato e três ratas, das respectivas linhagens, foram colocados na mesma caixa. O dia zero de prenhez foi determinado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal matinal.

As SHR utilizadas foram provenientes de uma linhagem mantida pelo nosso grupo de pesquisa no biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP e as ratas Wistar foram provenientes de uma linhagem mantida no biotério central da mesma faculdade. Os animais receberam ração padrão e água *ad libitum* e foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 – 24 °C) e umidade (45 – 65 %) com ciclo de luz (12 h claro/escuro). A técnica indireta de verificação da pressão arterial (pletismografia de cauda) foi realizada para verificação da pressão arterial sistólica (PAS) utilizando-se um pletismógrafo para ratos (PowerLab, ADInstruments, Melbourne, Austrália). As ratas foram consideradas hipertensas quando o valor de PAS foi maior ou igual a 150 mmHg.

### 4.2 Western blotting

As ratas foram previamente anestesiadas em câmara saturada com halotano e em seguida decapitadas para a remoção dos segmentos da aorta torácica e do

ramo mesentérico, os quais foram posteriormente dissecados, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C.

Para o protocolo experimental, os tecidos foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados separadamente em tampão RIPA (Tris-base 65,2 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, NP-40 1 %, deoxicolato de sódio 0,25 % e EDTA 0,8 mmol/L, suplementado com um coquetel de inibidores de protease) utilizando-se para isso um sonicador (Sonics Vibra Cell, Newtown, CT, EUA). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (4 °C, 10000 rpm por 20 minutos) para a separação do sobrenadante. A quantificação da concentração de proteína no sobrenadante foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA) como curva de concentração padrão. Sessenta microgramas (60 µg) de proteína total dos homogenatos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% ou 10% e posteriormente transferidas para a membrana de nitrocelulose. Depois da transferência, as membranas foram incubadas com BSA 5 % em tampão tris-salina com Tween 20 (TBS-T), por 1 h, à temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários presentes na Tabela 1, à 4 °C, *overnight*. Após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas por 10 minutos, 3 vezes, com tampão TBS-T e incubadas com anticorpos secundários correspondentes (Tabela 1) por 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o substrato para peroxidase quimioluminescente (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Little Chalfont, BKM, Reino Unido) e visualizadas pelo ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). A expressão de  $\beta$ -actina foi utilizada para normalização dos resultados. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com o programa ImageJ (versão 1.46r, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram expressos em Unidades arbitrárias (UA)/  $\beta$ -actina e foram comparados entre os grupos.

**Tabela 1** - Diluição dos anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos de Western Blotting.

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
<b>Anti-O-GlcNAc</b>	1:1000	sc-59623, Santa Cruz Biotechnology	Anti- camundongo IgG	1:2000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti- OGT</b>	1:500	sc-74547, Santa Cruz Biotechnology	Anti- camundongo IgG	1:4000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti- OGA</b>	1:500	SAB4200311, Sigma Aldrich	Anti- coelho IgG	1:5000	sc-2004, Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti- Cav-1</b>	1:2000	610406, BD Biosciences	Anti- camundongo IgG	1:3000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti- p-Cav-1 (Tyr<sup>14</sup>)</b>	1:1000	611338, BD Biosciences	Anti- camundongo IgG	1:2000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti- CaM</b>	1:250	sc-137079, Santa Cruz Biotechnology	Anti- camundongo IgG	1:1000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti- Hsp90</b>	1:2000	610418, BD Biosciences	Anti- camundongo IgG	1:1000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology
<b>β-actina</b>	1:10000	A5441, Sigma Aldrich	Anti- camundongo IgG	1:12000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology

#### 4.3 Atividade da O-GlcNAcase (OGA)

As proteínas dos homogenatos de aorta e de leito mesentérico foram extraídas de acordo com o item anterior (4.2) e quantificadas usando o método de Bradford (1976). As proteínas (2 µg) foram eluídas em 100 µL de tampão citrato (0,05 mol/L, pH 5,0). Após a eluição, adicionou-se o substrato da OGA, 4-Methylumbelliferyl N-acetil-p-D-glucosaminide (4-MUNAG, 300 µg/mL) na ausência ou presença do inibidor da OGA, Thiamet G (10 mmol/L). A reação ocorreu em estufa a 37 °C durante 30 minutos. Em seguida, a reação foi parada com a adição de tampão de glicina (0,1 mol/L, pH 12). A quebra do 4-MUNAG pela OGA emite fluorescência após excitação de 362 nm e emissão de 448 nm (FlexStation® 3 Multi-

Mode Microplate Reader). Os valores foram expressos em unidades relativas de fluorescência (IF). Este protocolo está de acordo com a metodologia descrita por Costa *et al.*, 2018.

#### **4.4 Reatividade vascular**

##### **4.4.1 Reatividade vascular em artéria de condutância (artéria aorta)**

Após anestesia, realizada em câmara saturada de halotano, e decapitação das ratas, a aorta torácica foi removida, dissecada e cortada em anéis de 2 mm em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (composição em mmol/L: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 14,9; glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) 5,5; CaCl<sub>2</sub> 1,6, pH 7,4) a 4 °C. Os anéis tiveram seu endotélio preservado ou mecanicamente removido com auxílio de uma haste metálica e foram então posicionados entre dois ganchos de aço inoxidável conectados a um transdutor de força isométrica (DMT, ADInstruments, Melbourne, VIC, Austrália) em cubas contendo solução de Krebs-Henseleit, 37 °C, pH 7,4 e suprimento gasoso de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>. Os anéis foram mantidos por um período de 30 minutos sob tensão basal de 30 mN para estabilização. Após, os anéis foram estimulados com solução de Krebs KCl (120 mmol/L) para testar a integridade funcional, e então foram lavadas com solução de Krebs até o vaso retornar para sua tensão basal. Foram considerados viáveis aqueles anéis que atingiram contração  $\geq 10$  mN. A integridade e funcionalidade do endotélio foi verificada pelo grau de relaxamento induzido por acetilcolina (ACh 1  $\mu$ mol/L) após contração prévia com fenilefrina (PE 100 nmol/L). Anéis que apresentaram relaxamento a ACh  $\geq 80$  % foram considerados com endotélio (E+) e anéis com relaxamento a ACh  $\leq 10$  % foram considerados sem endotélio (E-). Para os anéis de aortas de SHR, a integridade e funcionalidade do endotélio foram consideradas quando ACh (1  $\mu$ mol/L) induziu relaxamento  $\geq 70$  %.

##### **4.4.2 Reatividade vascular em artéria de resistência (artéria mesentérica)**



O leito mesentérico foi removido de cada rata e disposto em uma placa de Petri adaptada contendo solução de Krebs-Henseleit a 4 °C, para que as artérias mesentéricas pudessem ser isoladas. Foi realizada a remoção do tecido adiposo perivascular dos 2<sup>o</sup> e/ou 3<sup>o</sup> ramos das artérias mesentéricas (diâmetro interno de 200-300 µm) e cortadas em anéis de 2 mm com auxílio de um estereomicroscópio (Labomed, Los Angeles, EUA). Em alguns anéis de artérias foi realizada a remoção do endotélio, utilizando um fio de cabelo humano, previamente lavado com etanol (70 %) e solução de Krebs-Henseleit, que foi inserido no lúmen das artérias, sendo realizado um movimento delicado e contínuo, para remoção do endotélio vascular.

Um segundo fio de tungstênio também foi transpassado no anel da artéria mesentérica e as extremidades dos dois fios de tungstênio foram presas em dois novos parafusos de lados opostos da mesma cuba contendo solução de Krebs-Henseleit, 37 °C, pH 7,4 e suprimento gasoso de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>. O miógrafo é conectado a um sistema de aquisição de dados (ADInstruments, Melbourne, Austrália) e a um computador para registro das variações de tensão isométricas obtidas.

Os anéis foram mantidos por um período de 20 minutos na cuba para estabilização e posteriormente estirados gradativamente até atingirem uma tensão de repouso ótima (basal) em relação ao seu diâmetro interno, por meio do cálculo da relação tensão/diâmetro obtida pela circunferência interna correspondente à pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (IC100), realizado pelo software específico (DMT Normalization Module, ADInstruments). As artérias foram mantidas com uma circunferência interna IC1, calculada  $IC1 = 0.90 \times IC100$ , na qual o desenvolvimento de força é máximo, de acordo com Mulvany e Hapern (1977). O diâmetro luminal efetivo foi determinado pela equação  $l1 = IC1/\pi$ , variando de 200 a 300 µm nos vasos utilizados como artérias de resistência.

Os anéis foram então mantidos por um período de 30 minutos, com tensão basal, em cuba contendo solução de Krebs-Henseleit e lavados a cada 10 minutos. Após a normalização, a integridade funcional dos anéis foi testada com solução de Krebs KCl (120 mmol/L), por 10 minutos. Foram consideradas viáveis os anéis que atingiram contração  $\geq 6$  mN. A integridade do endotélio foi verificada pelo grau de relaxamento induzido por ACh (1 µmol/L) após contração prévia com PE (100

nmol/L). Anéis que apresentaram relaxamento a ACh  $\geq 80$  % foram considerados com endotélio (E+) e anéis com relaxamento a ACh  $\leq 10$  % foram considerados sem endotélio (E-). Para os anéis de aortas de SHR, a integridade e funcionalidade do endotélio foram consideradas quando ACh (1  $\mu\text{mol/L}$ ) induziu relaxamento  $\geq 70$  %.

Após a lavagem com Krebs-Henseleit para os anéis voltarem a sua tensão basal, os protocolos descritos no tópico 4.4.3 foram realizados.

#### **4.4.3 Efeito do PugNAc na reatividade vascular à fenilefrina (PE) em anéis de aortas e artérias mesentéricas de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes**

Anéis de aorta e de artéria mesentérica de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes foram incubados com metanol (veículo) ou PugNAc (100  $\mu\text{mol/L}$ ) durante 24 horas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com penicilina e estreptomicina e fungicida, mantidos em incubadora de CO<sub>2</sub>, como descrito no protocolo experimental de Lima *et al.* (2008). Após o período de incubação, anéis de aorta e artéria mesentérica com endotélio (E+), sem endotélio (E-) ou na ausência ou presença de L-NAME (100  $\mu\text{mol/L}$ , inibidor da enzima NOS), foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas de PE (0,1 nmol/L a 100  $\mu\text{mol/L}$ ). As curvas concentração-efeito para PE obtidas nos vasos de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes, foram comparadas.

#### **4.4.4 Efeito da metil- $\beta$ -ciclodextrina (dextrina) na reatividade vascular à fenilefrina (PE) e à acetilcolina (ACh) em anéis de aortas de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes**

Anéis de aorta com endotélio (E+) foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas de PE e ACh (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) na ausência ou presença da metil- $\beta$ -ciclodextrina (10 ou 20 mmol/L), considerada uma droga desorganizadora de cavéola, após 60 minutos de incubação prévia. As curvas para PE e ACh obtidas nestas condições experimentais foram comparadas entre os anéis de aorta de ratas prenhes e não prenhes, normotensas e hipertensas.

## **4.5 Microscopia Eletrônica**

### **4.5.1 Preparo do tecido para estudo utilizando microscopia eletrônica**

A técnica utilizada foi uma adaptação do método descrito por Moreira *et al.* (1996). Estes experimentos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Jorge E. Moreira do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

### **4.5.2 Fixação do material**

As ratas foram decapitadas, suas aortas e artéria mesentérica isoladas e dissecadas dos tecidos conjuntivos. Anéis de aorta (2 mm) e de artéria mesentérica (2 mm) foram incubados ou não com a droga metil- $\beta$ -clicodextrina (Dextrina, 10 nmol/L) por 1 hora, em cubas com solução de Krebs, pH 7.4, a 37 °C. Após, foi realizada a fixação dos tecidos em solução de glutaraldeído 2 % (v/v) e paraformaldeído 2 % (v/v), preparadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol/L. Estes anéis permaneceram nesta solução por 6 horas, a 4 °C, e a seguir foram lavados apenas com tampão cacodilato de sódio 0,1 mol/L. Após a fixação, os anéis de aorta e de artéria mesentérica foram submersos em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>, 1 %), utilizado para preservar a membrana plasmática e a membrana das organelas, e mantidos em gelo por 2 horas. Em seguida, foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol/L por duas vezes, durante 10 minutos. Após esse procedimento, os anéis foram lavados com tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 5,0 por duas vezes, durante 10 minutos, sempre mantidos em gelo.

### **4.5.3 Impregnação (contraste em bloco)**

Os anéis de aorta e de artéria mesentérica foram impregnados com acetato de uranila 0,1 mol/L e lavados com ácido acético 0,1 mol/L, pH 5,0 por 24 horas, sob agitação, a 4 °C.

#### **4.5.4 Desidratação**

Os anéis de aorta e de artéria mesentérica foram desidratados, com etanol 50 %, 75 %, 85 % e 95 % respectivamente, durante 10 minutos, com cada concentração. Por último, os anéis foram desidratados com etanol 100 % por duas vezes, durante 5 minutos e em seguida foram incubados com óxido de propileno 100% para completa desidratação. Infiltração: Os anéis foram infiltrados com araldite e óxido de propileno (1:1) sob agitação, durante 24 horas. Em seguida foram infiltrados, nesta ordem: araldite + óxido de propileno (2:1), sob agitação, durante 4 horas; araldite + óxido de propileno (3:1), sob agitação, durante 4 horas; araldite (100 %), durante 24 horas.

#### **4.5.5 Encapsulação**

Após a infiltração as amostras foram colocadas em estufa a 60°C, para amolecer e retirar a araldite. Em seguida, as cápsulas foram preenchidas com nova araldite (100 %) e as amostras foram colocadas nestas cápsulas durante 72 horas a 60 °C.

#### **4.5.6 Preparação dos blocos**

Após encapsulação, o material endurecido foi descapsulado e aparado com auxílio de gilete e lupa (aumento de duas vezes) para tirar o excesso de resina, facilitando os cortes no ultramicrotomo.

#### **4.5.7 Contraste para cortes no ultramicrotomo**

Os blocos aparados foram cortados (0,5 µm) em ultramicrotomo. Os cortes foram contrastados em azul de toluidina (1 %) e fixados com azul de toluidina: bórax (1 %) durante 1 minuto. Em seguida, os cortes corados foram observados no microscópio ótico, para delimitação da área a ser estudada no microscópio

eletrônico. Os cortes foram levados novamente ao ultramicrotomo para cortar as áreas especificadas e a seguir foram cortadas em fatias mais finas (50 a 70 nm).

#### **4.5.8 Contraste para observação no microscópio eletrônico**

As fatias coradas foram submersas em solução de acetato de uranila 50 % (v/v), durante 30 minutos e lavadas com água deionizada. Em seguida, foram submersas em citrato de chumbo (0,075 g/25 mL de hidróxido de sódio 0,2 mol/L). As amostras foram novamente lavadas com água deionizada, secadas em temperatura ambiente e levadas ao microscópio eletrônico acoplado a uma câmera fotográfica. Foram fotografadas imagens do endotélio das ratas, em aumento de 50.000 x, na posição transversal. O número de cavéolas foi contado e os resultados foram expressos como número de cavéolas pela área da célula ( $\mu\text{m}^2$ ).

#### **4.6 Análise estatística**

##### **Western blotting**

Os valores de densitometria óptica (DO) das bandas foram obtidos pelo programa Image J. Os valores de DO das bandas das proteínas alvo foram normalizados pelos valores das bandas de  $\beta$ -actina e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Foram realizados 5-6 experimentos diferentes para cada grupo. Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, La Jolla, CA, EUA) versão 6.0 (Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey). Diferenças entre os valores foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

##### **Atividade da OGA**

Os resultados foram calculados pela diferença entre os valores de leitura na ausência e presença de Thiamet G. A média foi obtida pela soma destes valores de cada grupo dividido pelo número de animal por grupo ( $n = 5-6$ ). Os dados foram

expressos como média  $\pm$  EPM, analisados quanto à distribuição e posteriormente submetidos à análise de variância (Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey), utilizando o programa GraphPad Prism. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### **Reatividade vascular**

Foram analisados os parâmetros farmacológicos de eficácia (Efeito Máximo, Emax) e potência ( $pD_2$ :  $-\log EC_{50}$ ). Os resultados de tensão isométrica foram expressos como a média  $\pm$  EPM. Os gráficos foram feitos pelo programa GraphPad Prism. As determinações da  $EC_{50}$  (concentração que produz 50 % da resposta máxima) foram realizadas pelo método de regressão não linear dos mínimos quadrados, utilizando-se o mesmo programa. A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos foi a análise de variância (One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey) ou Test  $t$  de Student, sendo adotado nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

### **Microscopia Eletrônica**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM, sendo que a média dos grupos representa a soma de 5 imagens diferentes de cada animal dividido pela quantidade de animal de cada grupo ( $n= 4-5$ ), os resultados foram expressos como número de cavéolas pela área da célula ( $\mu m^2$ ). A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism para comparação entre os grupos pela análise de variância (Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey) e as diferenças entre os valores foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

### **4.7 Drogas e Reagentes**

Os sais ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA,  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ), fosfato de potássio monohidratado ( $KH_2PO_4$ ), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio

(KCl), sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ), bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ), glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) e cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) foram adquiridos da Dinâmica (Diadema, Brasil). O 4-MUNAG (4-Methylumbelliferyl N-acetyl-b-D-glucosaminide), Tris-base ( $NH_2C(CH_2OH)_3$ ) e o deoxicolato de sódio são da marca Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). A albumina bovina foi adquirida da Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA).

As drogas acetilcolina (acetylcholine chloride), fenilefrina (L-phenylephrine hydrochloride), L-NAME (N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), Dextrina (Methyl-beta-cyclodextrin) e PugNAc (O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylideno) N-phenylcarbamate) foram obtidas da Sigma-Aldrich. A droga Thiamet G (3aR,5R,6S,7R,7aR)-2-(ethylamino)-3a,6,7,7a-tetrahydro-5-(hydroxymethyl)-5H-Pyrano[3,2-d]thiazole-6,7-diol) foi adquirida da Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, EUA). O halotano (Tanohalo ®) foi adquirido da Cristália, Brasil.

NP-40 (Nonidet P 40 Substitute), Tween-20, Laemmli (tampão de amostra concentrado) e 4-MUNAG (4-Methylumbelliferyl N-acetyl-b-D-glucosaminide) foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA).

O meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) e também penicilina/ estreptomicina e fungicida foram comprados da Gibco, Thermo Fischer Scientific, EUA.

O coquetel de inibidores de proteases (Protease Inhibitor Mix) foi adquirido da GE Healthcare (Little Chalfont, BKM, Reino Unido).

As informações referentes aos anticorpos, primários e secundários, utilizados nos experimentos de Western Blotting, estão listados na Tabela 1.

***RESULTADOS***



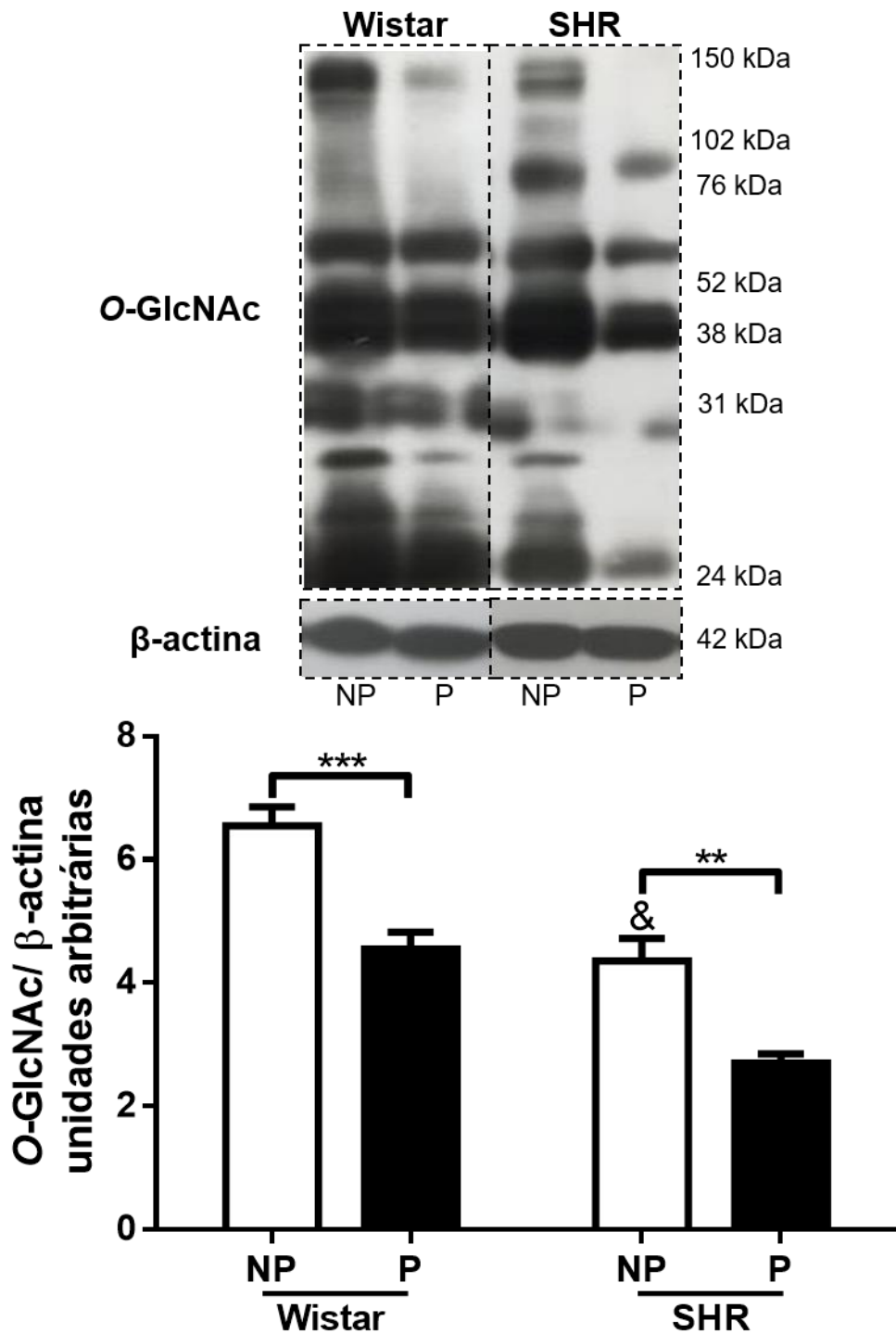
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Conteúdo da O-GlcNAcilação das proteínas em aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes

O conteúdo de proteínas O-GlcNAcizadas em aorta e leito mesentérico dos diferentes grupos foi analisada por Western blotting.

Ratas hipertensas apresentaram conteúdo reduzido de proteínas O-GlcNAcizadas em homogenatos de aorta quando comparada com homogenatos de aorta de ratas normotensas (Figura 1).

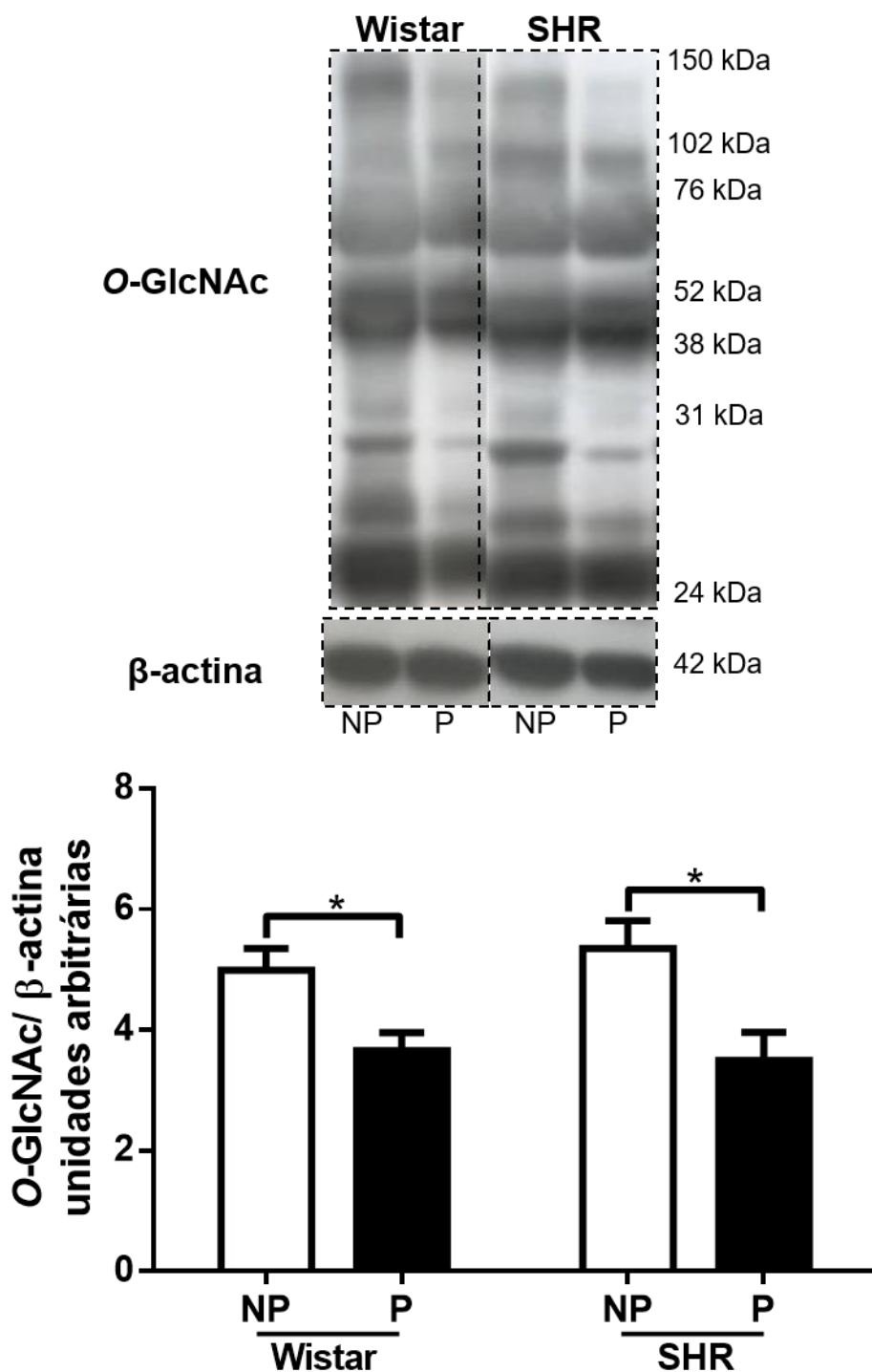
Observamos que o conteúdo de proteínas totais com ligação do tipo O-GlcNAc (em unidades arbitrárias, UA) foi significativamente diminuída em homogenatos de aorta de ratas Wistar prenhes ( $4.55 \pm 0.27$  UA,  $n = 6$ ) quando comparados com homogenatos de aorta de ratas Wistar não prenhes ( $6.55 \pm 0.30$  UA,  $n = 6$ ). Em homogenatos de aorta de SHR prenhes ( $2.70 \pm 0.14$  UA,  $n = 6$ ) o conteúdo de proteínas O-GlcNAcizadas também foi reduzida se comparada aos homogenatos de aorta de SHR não prenhes ( $4.35 \pm 0.36$  UA,  $n = 6$ ) (Figura 1).



**Figura 1** – Imagens das bandas e quantificação da expressão de proteínas O-GlcNAc/ β-actina em homogenatos de aorta de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 6) dos diferentes grupos. & p = 0,0001 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* SHR não prenhes; \*\*\* p < 0,001 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* Wistar prenhes e \*\* p < 0,01 entre os grupos SHR não prenhes *versus* SHR prenhes (ANOVA).

Em homogenatos de leito mesentérico (Figura 2) a o conteúdo de O-GlcNAcilação das proteínas não foi diferente entre ratas normotensas e ratas hipertensas.

O conteúdo de proteínas O-GlcNAcizadas estava reduzida em ratas Wistar prenhes ( $3.65 \pm 0.30$  UA,  $n = 6$ ) quando comparadas as ratas Wistar não prenhes ( $4.99 \pm 0.35$  UA,  $n = 6$ ). Homogenatos do leito mesentérico de SHR prenhes ( $3.49 \pm 0.47$  UA,  $n = 6$ ) apresentaram uma redução no conteúdo de proteínas com ligação O-GlcNAc do que homogenatos de leito mesentérico de SHR não prenhes ( $5.35 \pm 0.45$  UA,  $n = 6$ ) (Figura 2).



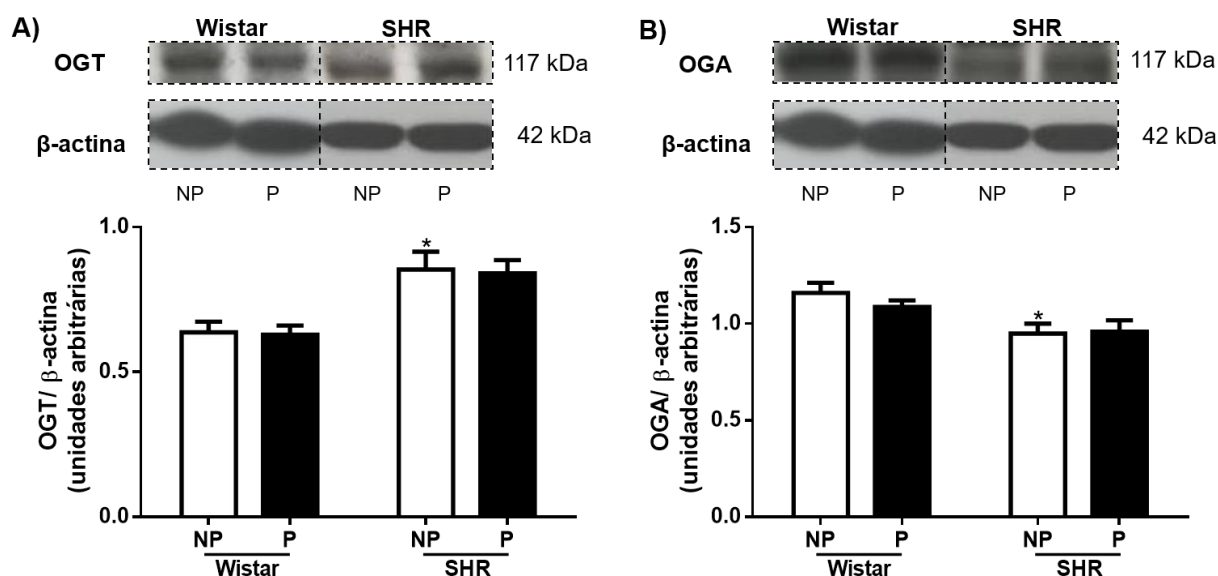
**Figura 2** - Imagens das bandas e quantificação da expressão de proteínas O-GlcNAc/  $\beta$ -actina em homogenatos de leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico (n = 6) dos diferentes grupos. \*  $p < 0,05$  entre os grupos Wistar não prenhes *versus* Wistar prenhes ou SHR não prenhes *versus* SHR prenhes (ANOVA).

## 5.2 Expressão da enzima OGT e OGA em homogenatos de aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes

A expressão proteica das enzimas que estão envolvidas no mecanismo de O-GlcNAcilação foi analisada em aorta e em leito mesentérico dos diferentes grupos.

A expressão da enzima OGT foi aumentada em homogenatos de aorta de SHR não prenhes em comparação a de ratas Wistar não prenhes, porém sua expressão não foi alterada pela prenhez em homogenatos de aorta de ratas Wistar (NP:  $0.63 \pm 0.03$  UA, n = 6; P:  $0.62 \pm 0.03$  UA, n = 6) ou em homogenatos de aorta de SHR (NP:  $0.85 \pm 0.06$  UA, n = 5; P:  $0.84 \pm 0.04$  UA, n = 5) (Figura 3A).

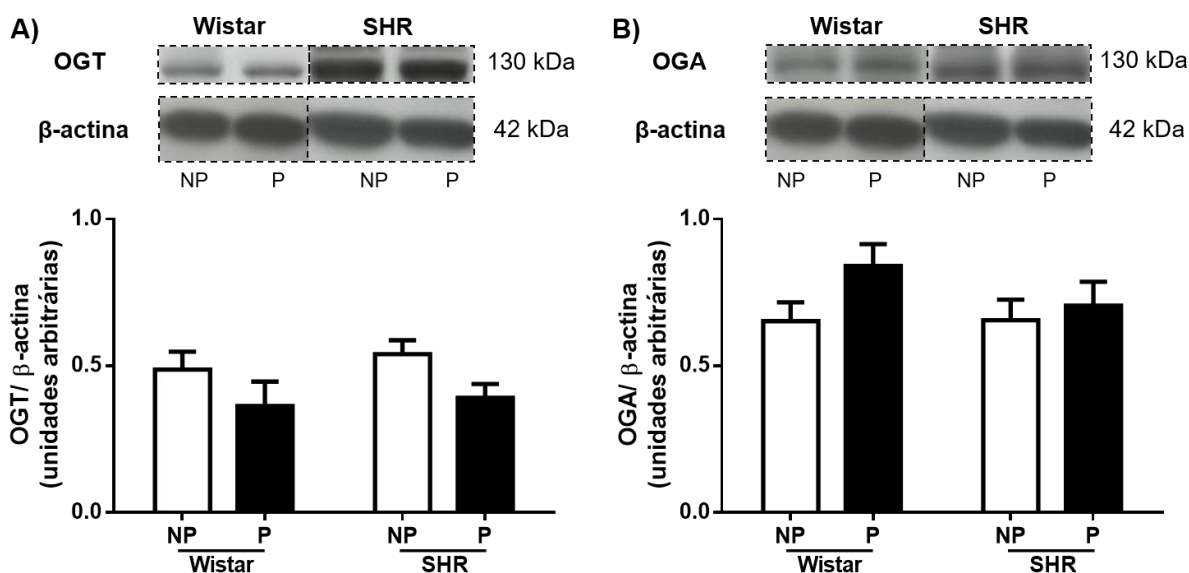
A expressão da enzima da OGA (Figura 3B) foi reduzida em homogenatos de aorta de ratas hipertensas quando comparada com a de ratas normotensas. A expressão da OGA não foi alterada pela prenhez em homogenatos de aorta de ratas Wistar (NP:  $1.16 \pm 0.05$  UA, n = 6; P:  $1.08 \pm 0.33$  UA, n = 6). Não observamos diferenças significativas na expressão da enzima OGA em homogenatos de aorta SHR prenhes (NP:  $0.94 \pm 0.05$  UA, n = 6; P:  $0.96 \pm 0.05$  UA, n = 6).



**Figura 3** - Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica de A) OGT/  $\beta$ -actina e B) OGA/  $\beta$ -actina em homogenatos de aorta de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 6) dos diferentes grupos. \* p < 0,05 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* SHR não prenhes (ANOVA).

A expressão da enzima OGT e da enzima OGA em homogenatos de leito mesentérico de ratas Wistar não foi diferente da expressão observada em leito mesentérico de SHR.

Em leito mesentérico, a expressão da OGT não foi alterada durante a prenhez de Wistar (NP:  $0.48 \pm 0.06$  UA, n = 6; P:  $0.36 \pm 0.08$  UA, n = 6) e também de SHR (NP:  $0.53 \pm 0.04$  UA, n = 6; P:  $0.39 \pm 0.04$  UA, n = 6) (Figura 4A). A prenhez não alterou a expressão da enzima OGA em leito mesentérico de ratas Wistar (NP:  $0.65 \pm 0.06$  UA, n = 6; P:  $0.84 \pm 0.07$  UA, n = 6) bem como em leito mesentérico de SHR (NP:  $0.65 \pm 0.07$  UA, n = 5; P:  $0.70 \pm 0.08$  UA, n = 5) (Figura 4B).

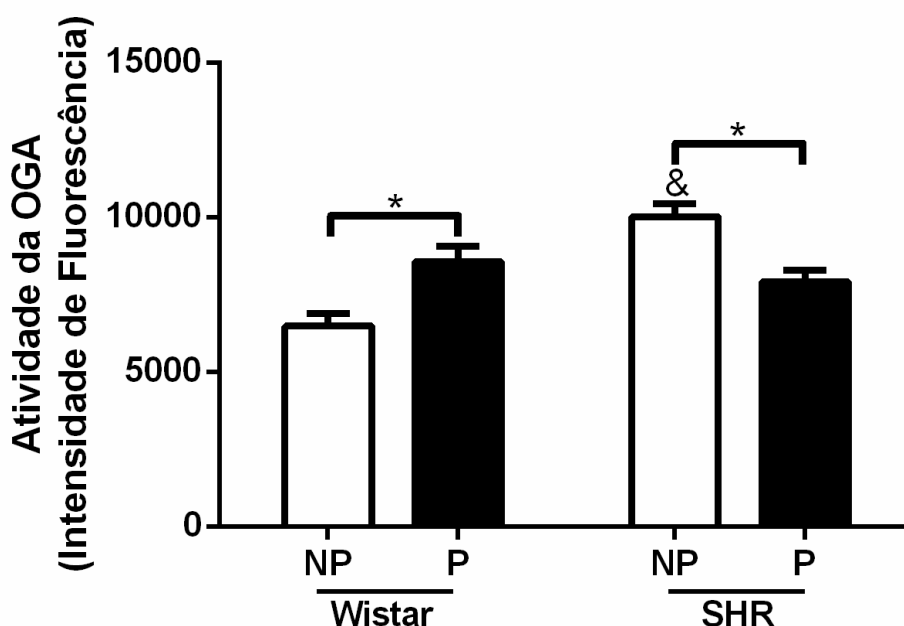


**Figura 4** - Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica de A) OGT/ β-actina e B) OGA/ β-actina em homogenatos de leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico (n = 6) dos diferentes grupos (ANOVA).

### 5.3 Atividade da O-GlcNAcase (OGA) em homogenatos de aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes

Ratas hipertensas apresentaram atividade aumentada da enzima OGA em homogenatos de aorta quando comparada a de ratas normotensas Wistar (Figura 5).

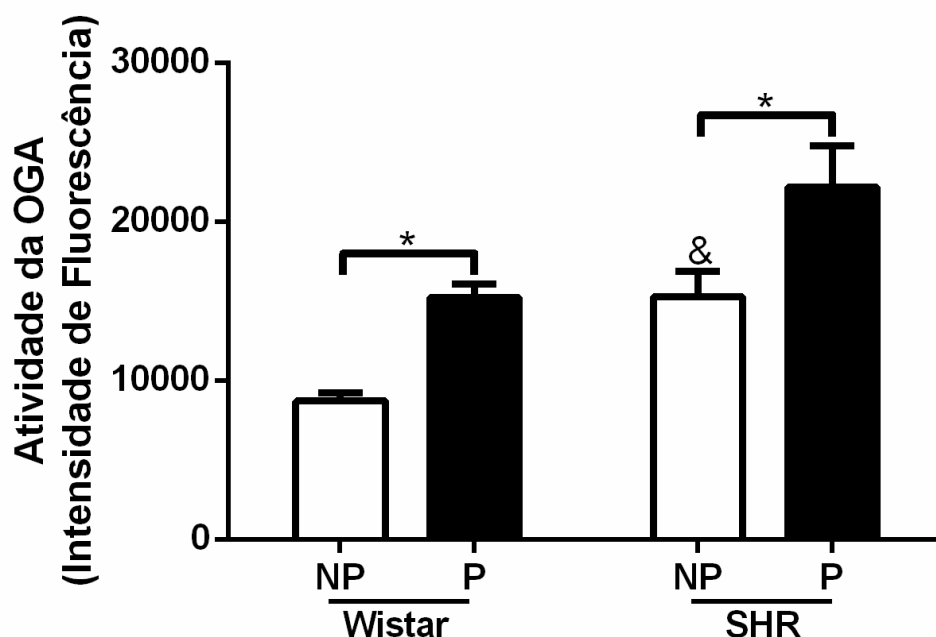
A atividade da OGA (em intensidade de fluorescência, IF) estava aumentada em homogenatos de aorta de ratas Wistar prenhes ( $8554 \pm 497.5$  IF,  $n = 6$ ) se comparada a observada em aorta de ratas Wistar não prenhes ( $6484 \pm 411.5$  IF,  $n = 6$ ). No entanto, em homogenatos de aorta de SHR prenhes, a atividade da enzima OGA foi diminuída ( $7910 \pm 389.1$  IF,  $n = 6$ ) quando comparada com aortas de SHR não prenhes ( $10022 \pm 423.4$  IF,  $n = 6$ ) (Figura 5).



**Figura 5** - Atividade da enzima O-GlcNAcase (OGA), em intensidade de fluorescência, em homogenatos de aorta de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas ( $n = 6$ ) dos diferentes grupos. &  $p < 0,0001$  entre os grupos Wistar não prenhes *versus* SHR não prenhes, \*  $p < 0,05$  entre os grupos Wistar não prenhes *versus* Wistar prenhes ou SHR não prenhes *versus* SHR prenhes (ANOVA).

Assim como observado em homogenatos de aorta, SHR também apresentam atividade aumentada da enzima OGA em leito mesentérico quando comparado com as ratas Wistar normotensas (Figura 6).

A prenhez foi capaz de aumentar a atividade da enzima OGA (Figura 6) em homogenatos de leito mesentérico de ratas Wistar (NP:  $8713 \pm 503.5$  IF,  $n = 5$ ; P:  $15223 \pm 855.7$  IF,  $n = 6$ ) e de SHR (NP:  $15264 \pm 1600$  IF,  $n = 6$ ; P:  $22165 \pm 2628$  IF,  $n = 5$ ).



**Figura 6** - Atividade da enzima O-GlcNAcase (OGA), em intensidade de fluorescência, em homogenatos de leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico (n = 5-6) dos diferentes grupos. & p < 0,05 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* SHR não prenhes, \* p < 0,05 entre os grupos Wistar não prenhes *versus* Wistar prenhes ou SHR não prenhes *versus* SHR prenhes (ANOVA).

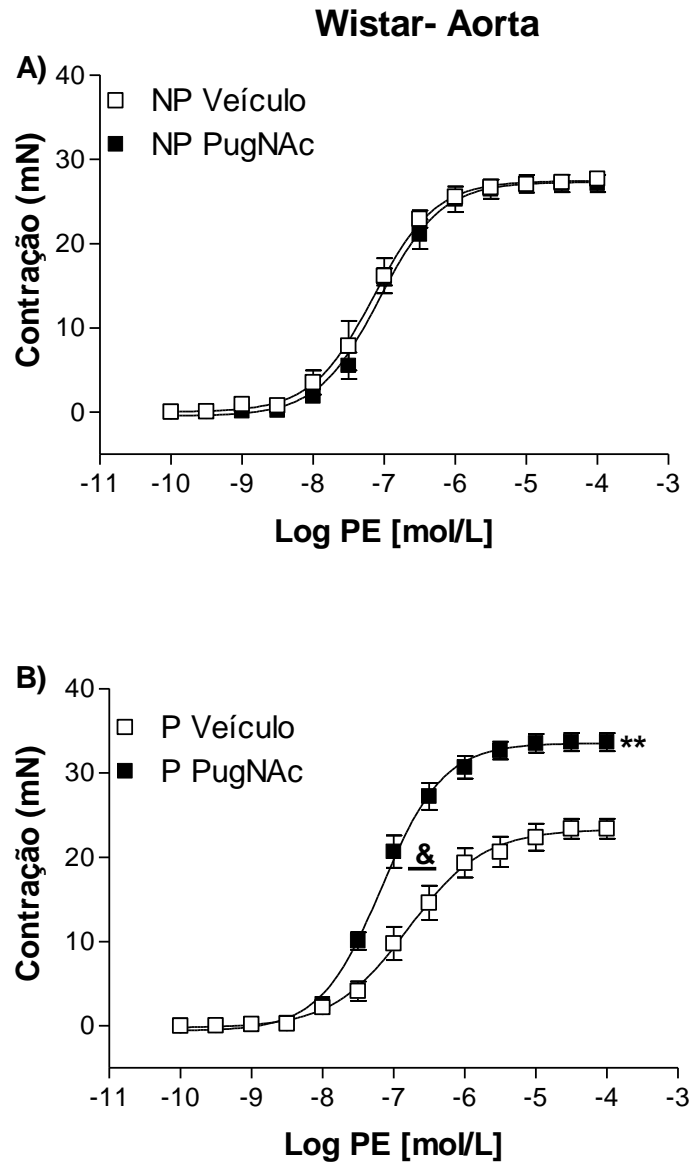
#### 5.4 Efeito do PugNAc na reatividade vascular à fenilefrina (PE) em aorta e artéria mesentérica de ratas Wistar não prenhes e prenhes

A hiporreatividade à PE (NP:  $27.68 \pm 0.58$  mN, n = 6; P:  $23.40 \pm 1.18$  mN, n = 6) e a redução da potência da PE (pD<sub>2</sub> NP:  $7.19 \pm 0.12$ , n = 6; P:  $6.78 \pm 0.32$ , n = 6) foi observada em anéis de aorta de ratas Wistar prenhes. A hiporreatividade à PE também foi observada em anéis de artéria mesentérica (NP:  $22.17 \pm 1.57$  mN, n = 6; P:  $17.32 \pm 0.82$  mN, n = 6) de ratas Wistar prenhes quando comparadas aos vasos de ratas Wistar não prenhes.

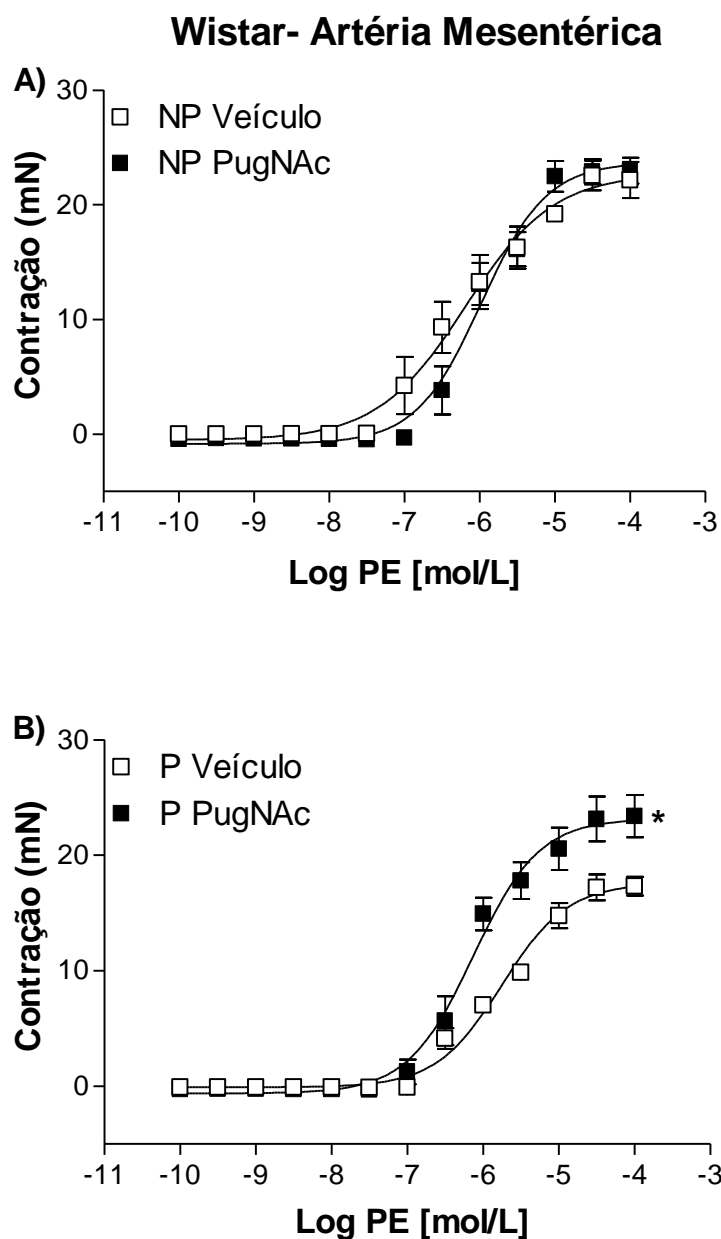
A incubação com PugNAc (100  $\mu$ mol/L), inibidor da OGA, não alterou a reatividade de anéis de aorta ( $27.13 \pm 1.01$  mN, n = 6) ou anéis de artéria mesentérica ( $22.99 \pm 1.13$  mN, n = 5) de ratas Wistar não prenhes à PE. No entanto, o PugNAc aumentou a resposta contrátil à PE ( $33.66 \pm 1.07$  mN, n = 6) e aumentou



a potência da PE (Veículo:  $6.78 \pm 0.13$ ,  $n = 6$ ; PugNAc:  $7.15 \pm 0.06$ ,  $n = 6$ ) em anéis de aorta e a reatividade à PE ( $23.89 \pm 1.82$  mN,  $n = 6$ ) em anéis de artéria mesentérica de ratas Wistar prenhes se comparados aos incubados com veículo (Figuras 7 e 8).



**Figura 7** - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio incubados com veículo ou PugNAc por 24 horas (anéis incubados), de Wistar não prenhes (NP, em A) ou prenhes (P, em B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados ( $n = 6$ ). \*\*  $p < 0,01$  valores de  $E_{max}$  P PugNAc *versus* P Veículo, &  $p < 0.05$  valores de  $pD_2$  P Veículo *versus* P PugNAc (Test *t* de Student).



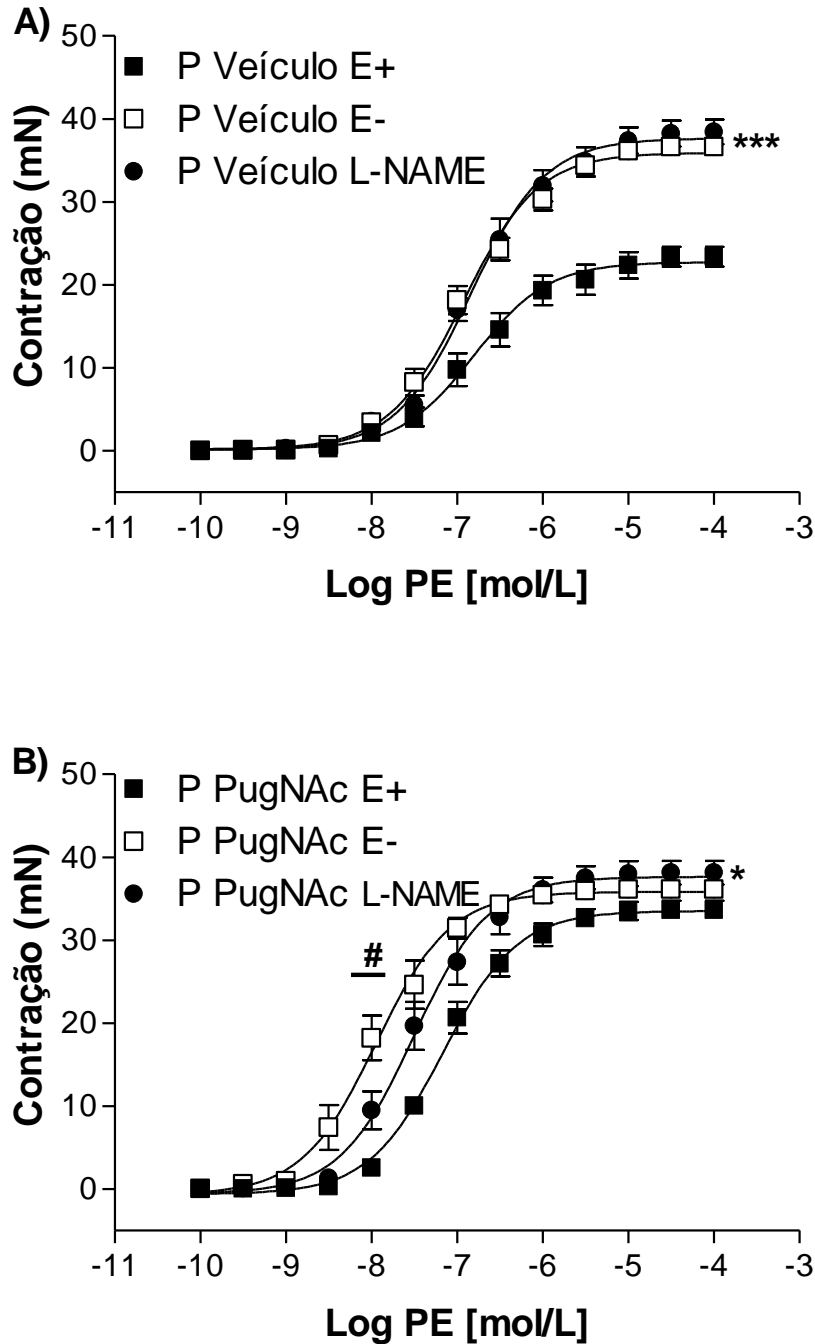
**Figura 8** - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio incubados com veículo ou PugNAC por 24 horas, de Wistar não prenhes (NP, em A) ou prenhes (P, em B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 6). \*\* p < 0,01 valores de Emax P Veículo *versus* P PugNAC (Teste t de Student).

A remoção do endotélio (E-) ou a incubação dos anéis intactos com L-NAME (100  $\mu$ mol/L) aumentou significativamente a resposta contrátil à PE em anéis de aorta veículo (L-NAME: 38.44  $\pm$  1.5 mN, n = 7; E-: 36.65  $\pm$  0.67 mN, n = 7) e em

anéis de artéria mesentérica veículo (L-NAME:  $24.77 \pm 1.84$  mN, n=5; E-:  $24.00 \pm 1.64$  mN, n = 5) de ratas Wistar prenhes (Figuras 9A e 10A). Porém, em anéis de aortas e de artérias mesentéricas incubados com PugNAc, de ratas Wistar prenhes (Figuras 9B e 10B), a remoção do endotélio não alterou o Emax das curvas concentração-resposta para PE (E- aorta:  $36.14 \pm 0.50$  mN, n = 6; E- artéria mesentérica:  $27.48 \pm 1.56$  mN, n = 5) embora a potência da PE em aorta tenha sido aumentada ( $pD_2$  E+:  $7.15 \pm 0.06$ , n = 6; E-:  $7.94 \pm 0.15$ , n = 7).

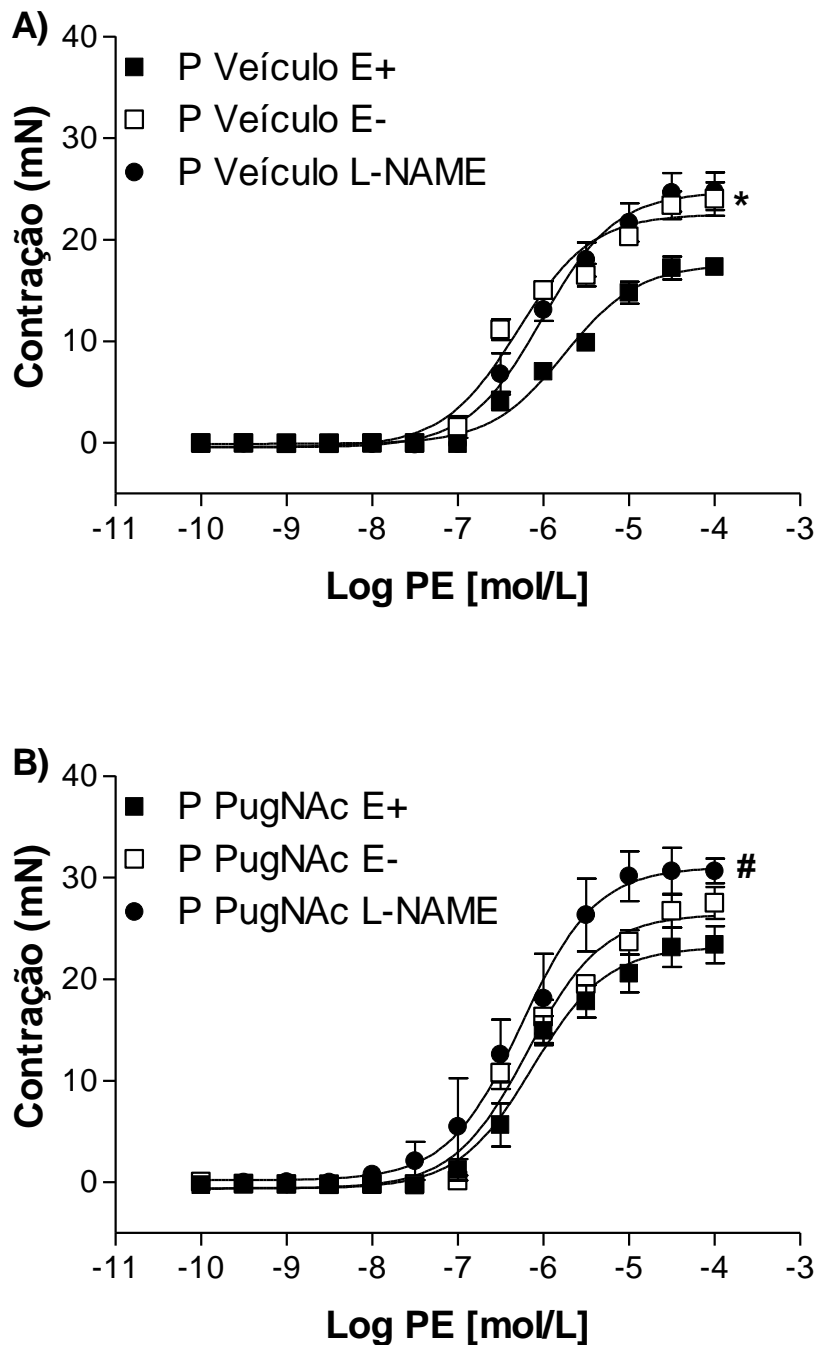
O L-NAME aumentou a resposta contrátil à PE em aorta ( $38.15 \pm 1.43$  mN, n = 7) e em artéria mesentérica ( $30.66 \pm 1.21$  mN, n = 4) e a potência da PE em aortas ( $pD_2$  L-NAME:  $7.47 \pm 0.13$ , n = 7) incubados com PugNAc, porém o efeito do L-NAME nestes vasos de ratas Wistar prenhes foram menos significativos do que os efeitos observados em vasos não incubados com PugNAc (Figuras 9B e 10B).

## Wistar- Aorta



**Figura 9** - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas com endotélio (E+, quadrado preto), sem endotélio (E-, quadrado branco) ou incubados com L-NAME (100  $\mu$ mol/L, círculo fechado) de Wistar prenhes, incubados com veículo (A) ou PugNac (B) por 24 horas em DMEM. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 6-7). \*\*\* p < 0,001 valores de Emax P Veículo E+ versus demais P Veículo- \* p < 0,05 valores de Emax P PugNac E+ versus P PugNac L-NAME, & p < 0,01 valores de pD<sub>2</sub> P PugNac E+ versus P PugNac E- and P PugNac L-NAME (ANOVA).

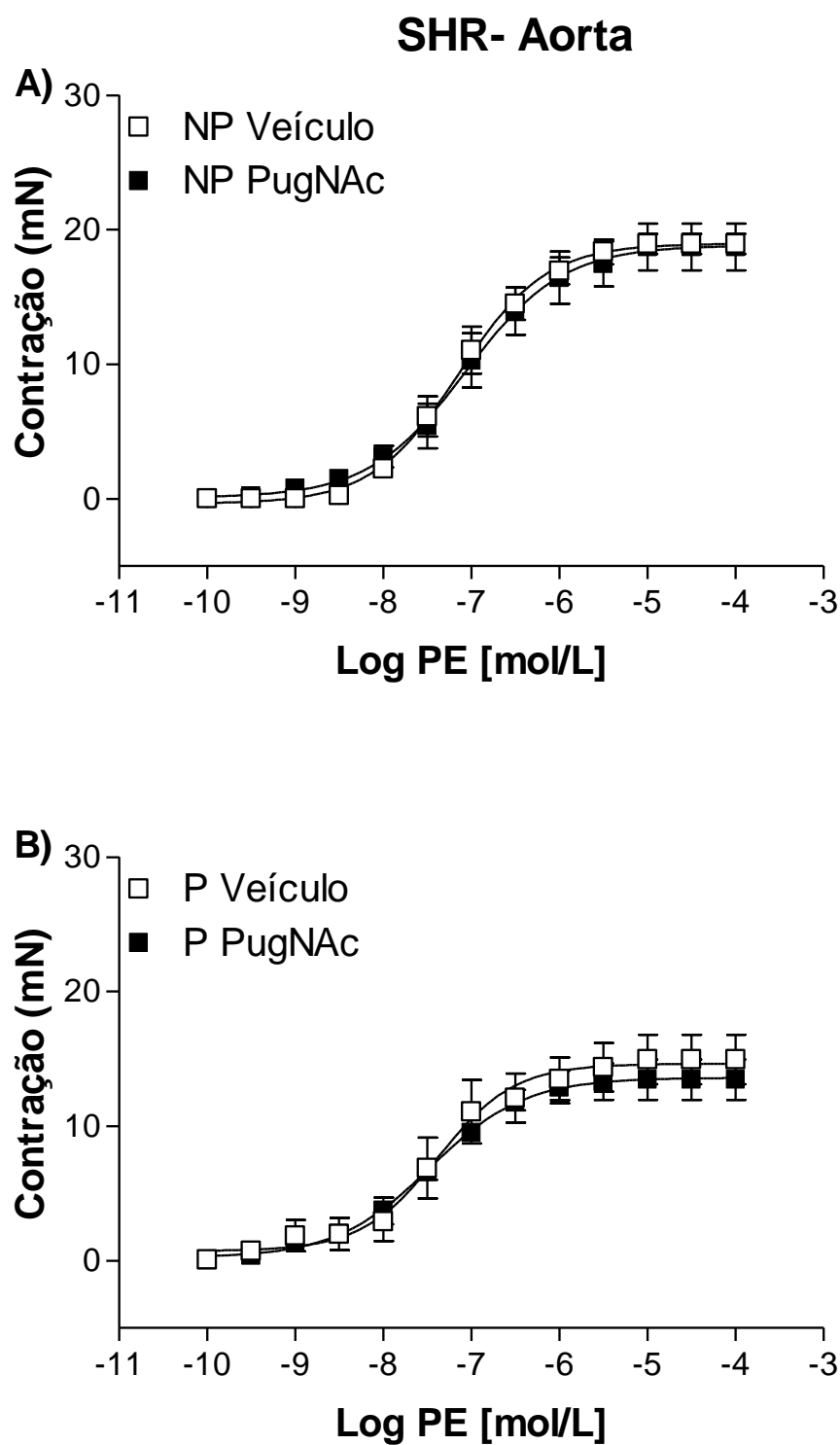
## Wistar- Artéria Mesentérica



**Figura 10** - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de artérias mesentéricas com endotélio (E+, quadrado fechado), sem endotélio (E-, quadrado aberto) ou incubados com L-NAME (100  $\mu$ mol/L, círculo fechado) de Wistar prenhes, incubados com veículo (A) ou PugNAc (B) por 24 horas em DMEM. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n= 6-7). \*p < 0,05 valores de Emax P Veículo E+ versus demais P Veículo E- e P Veículo L-NAME. # p < 0,05 valores de Emax P PugNAc E+ versus P PugNAc L-NAME (ANOVA).

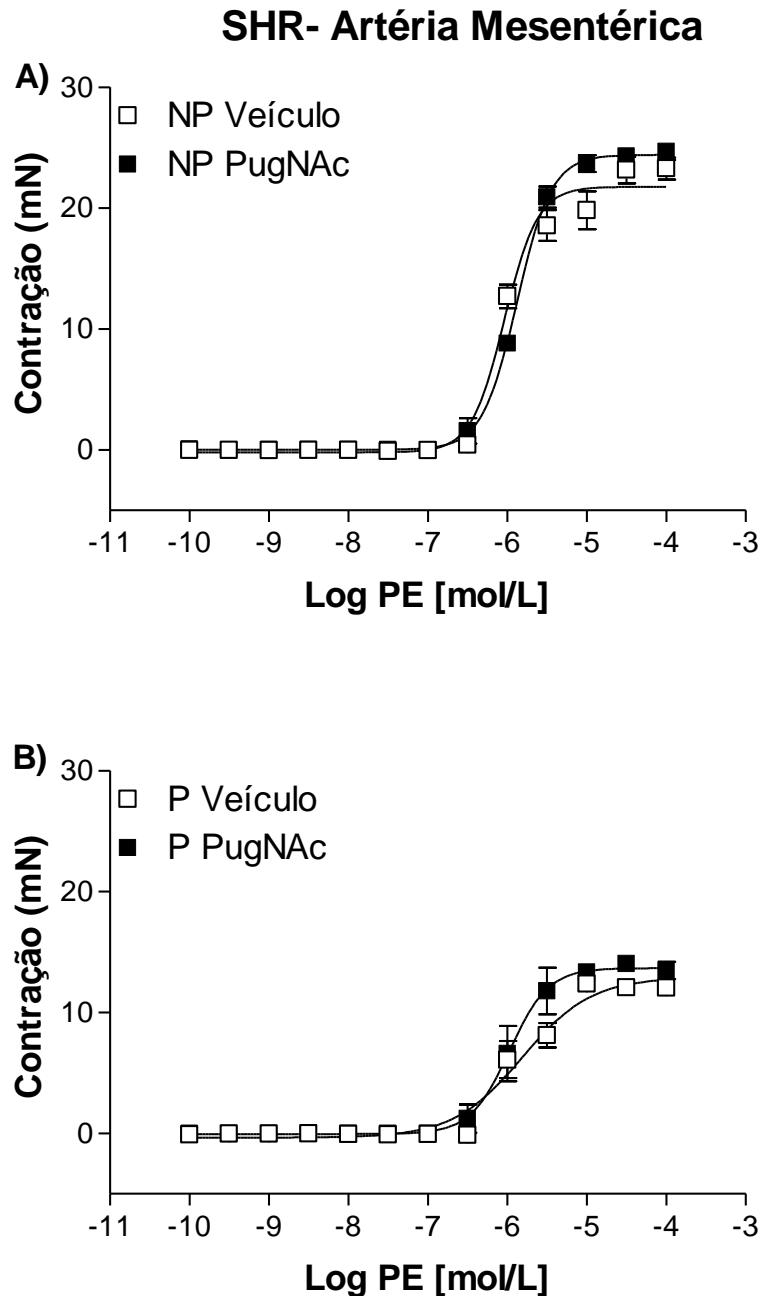
#### **5.4 Efeito do PugNAc na reatividade vascular à fenilefrina (PE) em aorta e artéria mesentérica de SHR não prenhes e prenhes**

A reatividade à PE observada em anéis de aorta de SHR prenhes (P:  $14.96 \pm 1.8$  mN,  $n = 6$ ) estava reduzida quando comparada a de anéis de aortas de SHR não prenhes (NP:  $18.95 \pm 0.73$  mN,  $n = 6$ ), embora a diferença estatística não tenha sido significativa ( $p = 0.052$ ). A incubação dos anéis com PugNAc não foi capaz de alterar a reatividade à PE em anéis de aorta de SHR não prenhes (Emax:  $18.71 \pm 1.73$  mN,  $n = 6$ ) ou de SHR prenhes (Emax:  $13.46 \pm 1.49$  mN,  $n = 6$ ) (Figura 11).



**Figura 11** - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio, incubados com veículo ou PugNAC por 24 horas (anéis incubados), de SHR não prenhes (NP, em A) ou prenhes (P, em B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 5-6).

A incubação com PugNAC também não alterou a reatividade à PE em anéis de artéria mesentérica de SHR não prenhes (Emax:  $24.66 \pm 0.69$  mN,  $n = 5$ ) e prenhes (Emax:  $13.49 \pm 0.71$  mN,  $n = 5$ ) (Figura 12).



**Figura 12** - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de artéria mesentérica com endotélio, incubados com veículo ou PugNAC por 24 horas (anéis incubados) de SHR não prenhes (NP, em A) ou prenhes (P, em B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados ( $n = 5-6$ ).

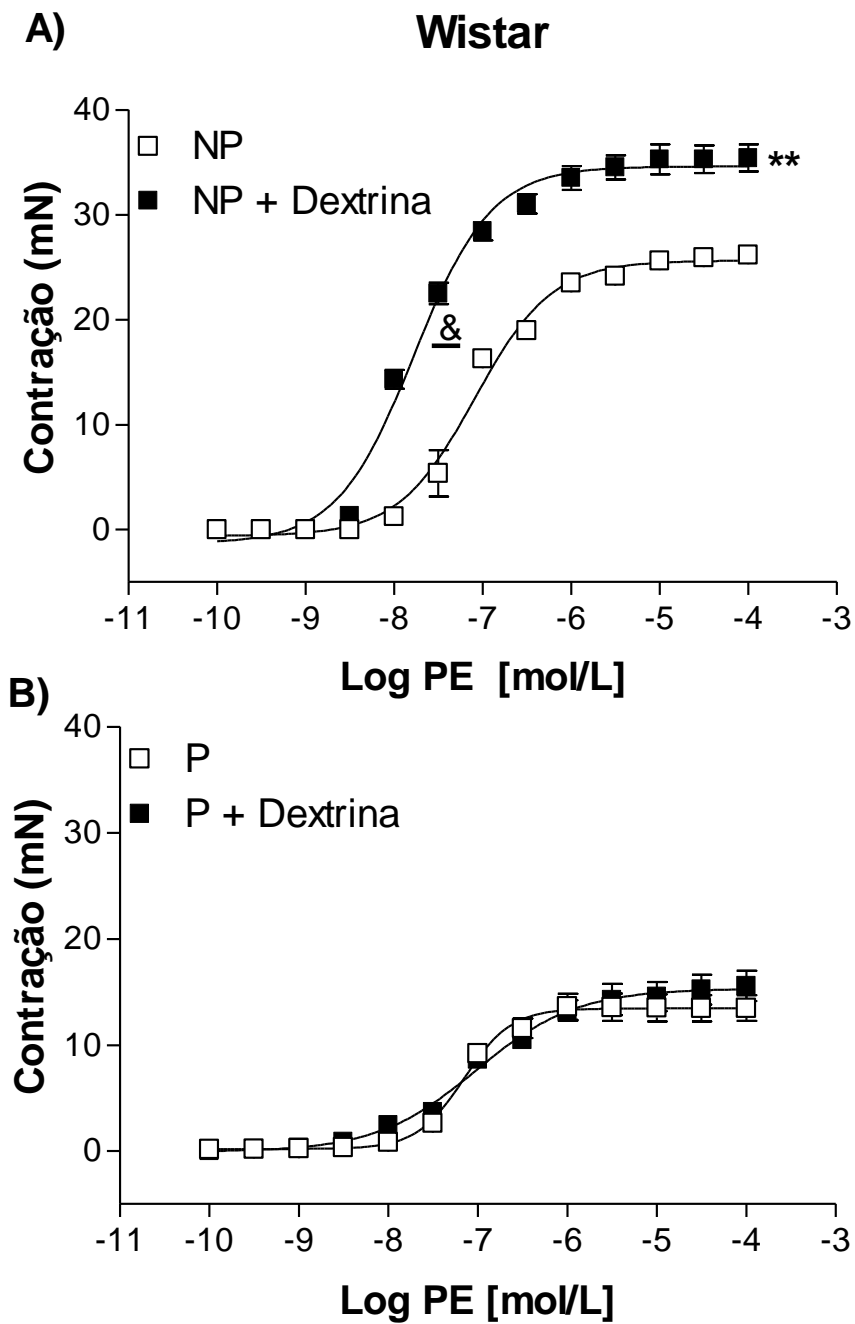


## 5.5 Efeito da metil- $\beta$ -ciclodextrina (dextrina) na reatividade vascular à fenilefrina (PE) e à acetilcolina (ACh) em aorta de ratas Wistar não prenhes e prenhes

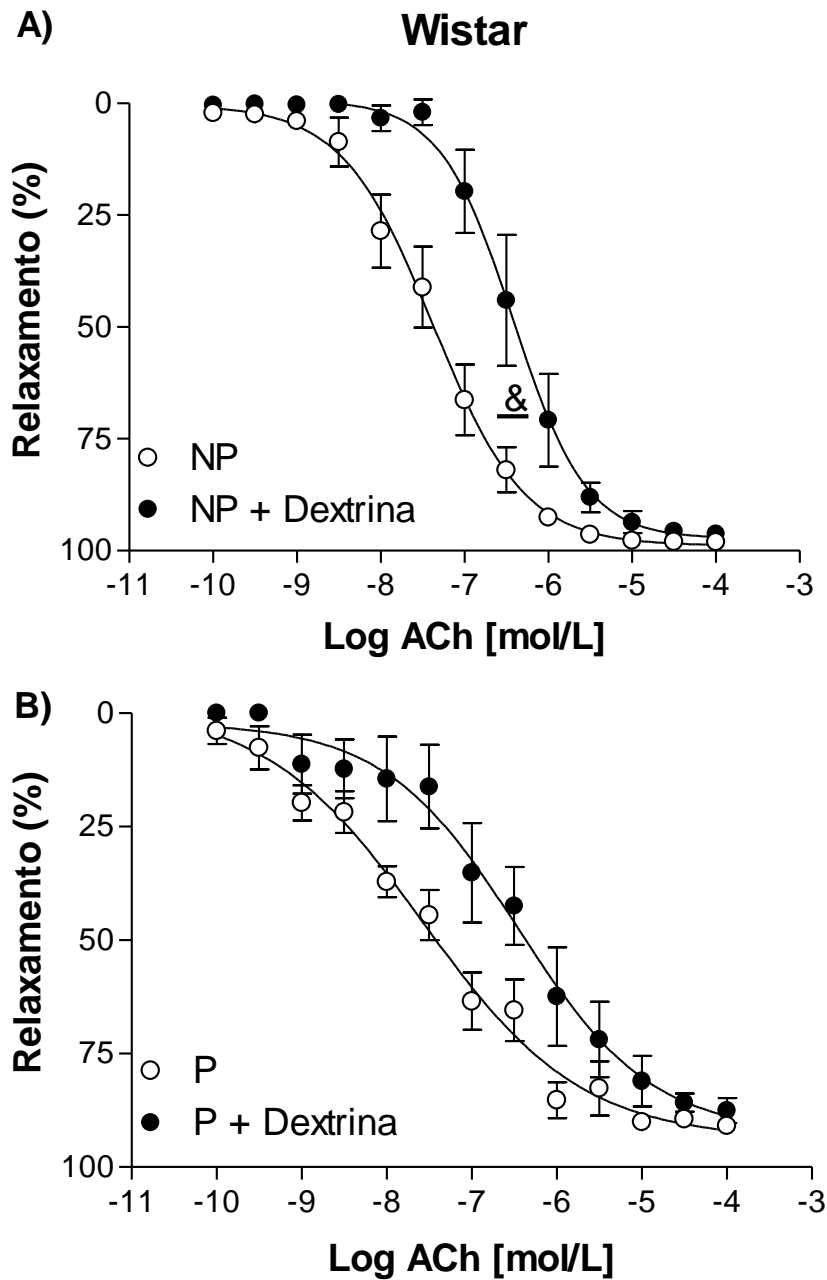
Utilizamos a metil- $\beta$ -ciclodextrina (dextrina) para desorganizar as cavéolas e conseqüentemente alterar da atividade da eNOS. Assim, avaliamos se a reatividade vascular à PE em aortas de ratas não prenhes e prenhes, Wistar e SHR seria alterada na presença da dextrina.

A pré-incubação com dextrina aumentou o Emax das curvas de PE em aortas de ratas não prenhes Wistar (NP:  $26.16 \pm 0.85$  mN, n = 5; NP + Dextrina:  $35.42 \pm 1.30$  mN, n = 5) e a potência da PE (NP:  $7.10 \pm 0.09$ , n = 5; NP + Dextrina:  $7.77 \pm 0.06$ , n = 5) (Figura 13A). Interessantemente, a dextrina não foi capaz de alterar o Emax das curvas para PE em aortas de ratas Wistar prenhes (P:  $13.48 \pm 1.21$  mN, n = 5; P + Dextrina:  $15.56 \pm 1.42$  mN, n = 5) bem como a potência da PE (P:  $7.16 \pm 0.06$ , n = 5; P+ Dextrina:  $6.82 \pm 0.50$ , n = 5) (Figura 13B).

Apesar da dextrina não alterar o Emax das curvas para ACh em aortas de ratas Wistar não prenhes (NP:  $98.11 \pm 1.16$  %, n = 5; NP + Dextrina:  $96.25 \pm 1.7$  %, n = 5), ela foi capaz de reduzir a potência da ACh nestes vasos (NP:  $7.38 \pm 0.18$ , n = 5; NP + Dextrina:  $6.45 \pm 0.19$ , n = 5) (Figura 14A). Em anéis de aorta de ratas Wistar prenhes, a dextrina não alterou as curvas concentração-efeito para ACh (Emax NP:  $90.96 \pm 0.78$  %, n = 6; NP + Dextrina:  $87.61 \pm 2.7$  %, n = 5; pD2: NP:  $7.28 \pm 0.33$ , n = 5; NP + Dextrina:  $6.51 \pm 0.50$ , n = 5) (Figura 14B).



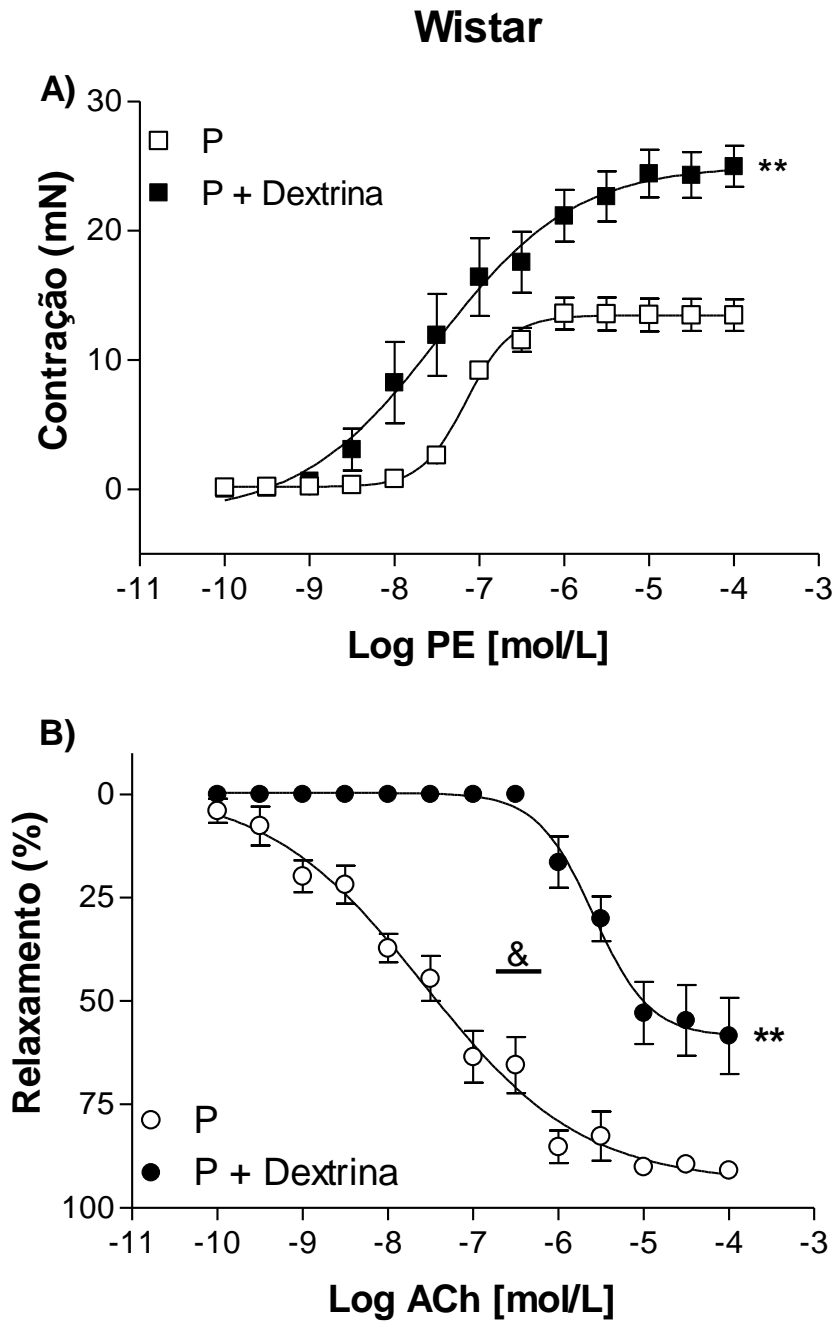
**Figura 13** - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas de ratas Wistar (A) não prenhes (NP) e (B) prenhes (P) na ausência ou na presença de Dextrina (10 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos ( $n = 5$ ). \*\* $p < 0,01$   $E_{max}$  NP versus NP + Dextrina, &  $p < 0,05$   $pD_2$  NP versus NP + Dextrina (Teste  $t$  de Student).



**Figura 14** - Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas de ratos Wistar não prenhes (NP, em A) e prenhes (P, em B) na ausência ou na presença de Dextrina (10 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos ( $n = 5$ ). \*  $p < 0,05$   $pD_2$  NP versus NP + Dextrina (Teste  $t$  de Student).

Nós avaliarmos se uma maior concentração de dextrina (20 mmol/L) seria capaz de alterar a reatividade à PE e à ACh em aortas de ratas Wistar prenhes.

O Emax das curvas concentração-efeito para PE aumentou na presença de dextrina (20 mmol/L) em aortas de Wistar prenhes ( $25.22 \pm 1.92$  mN,  $n = 5$ ), mas não observamos alteração da potência da PE ( $7.37 \pm 0.27$ ,  $n = 5$ ) nestas condições experimentais (Figura 15A). Em maior concentração, a dextrina (20 mmol/L) prejudicou o relaxamento induzido por ACh em aortas de ratas Wistar prenhes, observamos deslocamento da curvas para a direita ( $pD_2: 5.53 \pm 0.10$ ,  $n = 5$ ) com redução do efeito máximo (Emax:  $58.47 \pm 9.24$  %,  $n = 5$ ) (Figura 15B).



**Figura 15** - Curvas concentração-efeito (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) para fenilefrina (PE, em A) e acetilcolina (ACh, em B) em anéis de aortas de ratas Wistar prenhes (P) na ausência ou na presença de Dextrina (20 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos (n = 5). \*\* p<0,01 Emax P versus P + Dextrina; & p<0,01 pD<sub>2</sub> P versus P + Dextrina (Teste t de Student).

## 5.6 Efeito da metil- $\beta$ -ciclodextrina (dextrina) na reatividade vascular à fenilefrina (PE) e à acetilcolina (ACh) em aorta de SHR não prenhes e prenhes

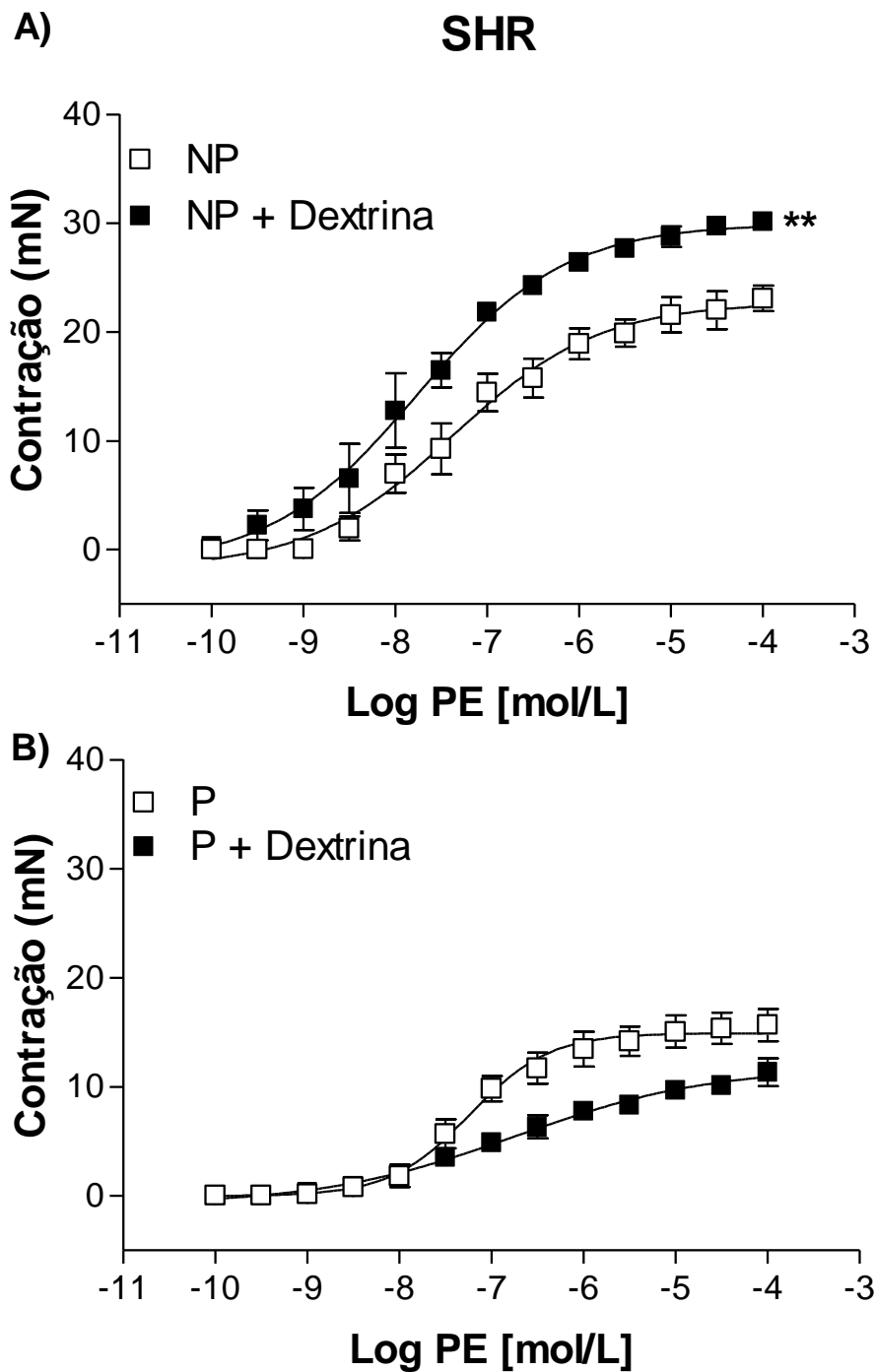
A contração induzida por PE foi aumentada na presença de dextrina em aortas de SHR ratas não prenhes (NP:  $23.08 \pm 1.18$  mN,  $n = 5$ ; NP + Dextrina:  $30.14 \pm 0.78$  mN,  $n = 5$ ), mas a potência da PE não foi alterada por esta droga (NP:  $7.39 \pm 0.54$ ,  $n = 5$ ; NP + Dextrina:  $7.89 \pm 0.44$ ,  $n = 5$ ) (Figura 16A). Em anéis de aorta de SHR prenhes, a dextrina não foi capaz de promover alterações significativas nos valores de Emax (NP:  $15.68 \pm 1.48$  mN,  $n = 5$ ; NP + Dextrina:  $11.32 \pm 1.28$  mN,  $n = 5$ ,  $p = 0.068$ ) ou de pD<sub>2</sub> das curvas concentração-efeito à PE (NP:  $7.12 \pm 0.22$ ,  $n = 5$ ; NP + Dextrina:  $7.30 \pm 0.17$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.057$ ) (Figura 16B).

A dextrina (10mmol/L) foi capaz de deslocar as curvas concentração-efeito para ACh para a direita em aortas de ratas não prenhes, ou seja, reduziu a potência da ACh (NP + Dextrina:  $6.50 \pm 0.23$ ,  $n = 5$ ; NP:  $7.50 \pm 0.17$ ,  $n = 5$ ), mas não de alterar o Emax (NP + Dextrina:  $88.73 \pm 3.48$  %,  $n = 6$ ; NP:  $90.60 \pm 4.30$  %,  $n = 5$ ) (Figura 17A). Nesta concentração a dextrina não alterou o perfil das curvas para ACh em anéis de aorta de SHR prenhes (Emax P:  $91.29 \pm 1.3$  %,  $n = 5$ ; P + Dextrina:  $94.40 \pm 3.89$  %,  $n = 5$ ; pD<sub>2</sub> P:  $8.5 \pm 0.42$ ,  $n = 5$ ; P + Dextrina:  $7.41 \pm 0.42$ ,  $n = 4$ ) (Figura 17B).

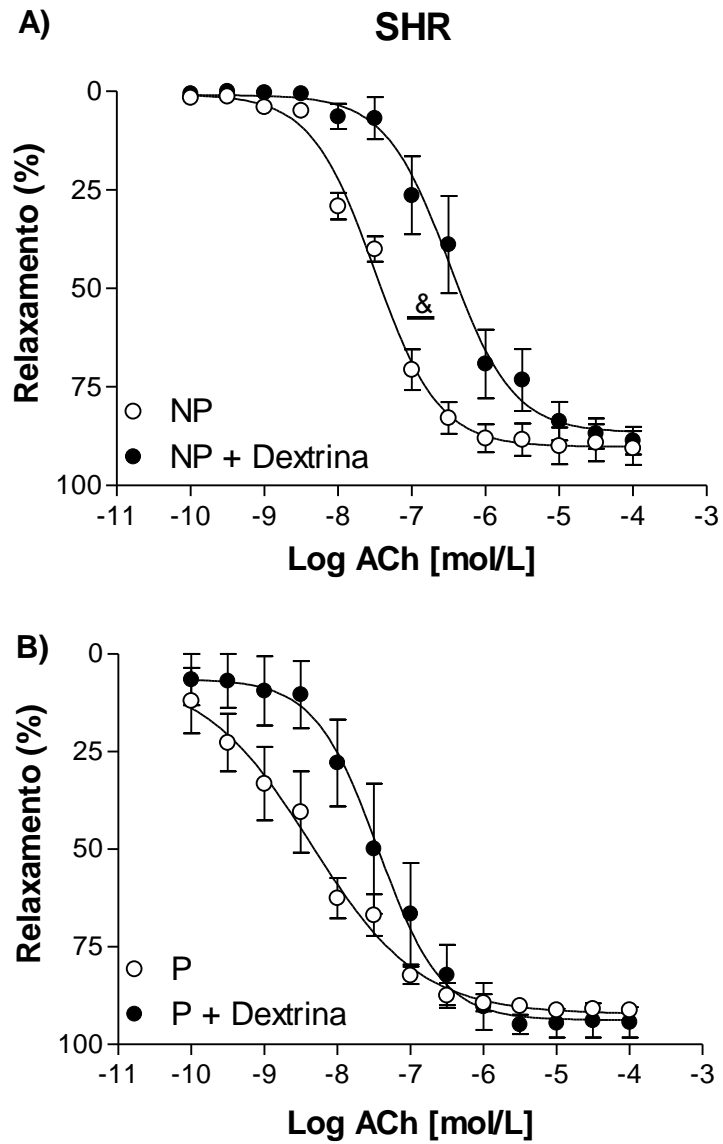
Avaliamos também se uma maior concentração de dextrina (20 mmol/L) seria capaz de alterar a reatividade vascular à PE e à ACh em aortas de SHR prenhes.

A dextrina 20 mmol/L deslocou as curvas concentração-efeito da PE para a esquerda, o valor de Emax foi aumentado na presença da maior concentração de dextrina em aortas de SHR prenhes ( $21.62 \pm 1.53$  mN,  $n = 5$ ) bem como a potência da PE ( $8.44 \pm 0.03$ ,  $n = 5$ ) (Figura 18A).

A dextrina 20mmol/L deslocou as curvas concentração-efeito da ACh para a direita, apesar de não ter alterado o relaxamento máximo induzido por ACh em aortas de SHR prenhes ( $95.33 \pm 2.05$  %,  $n = 6$ ), ela foi capaz de reduzir a potência da ACh ( $6.32 \pm 0.21$ ,  $n = 6$ ) (Figura 18B).

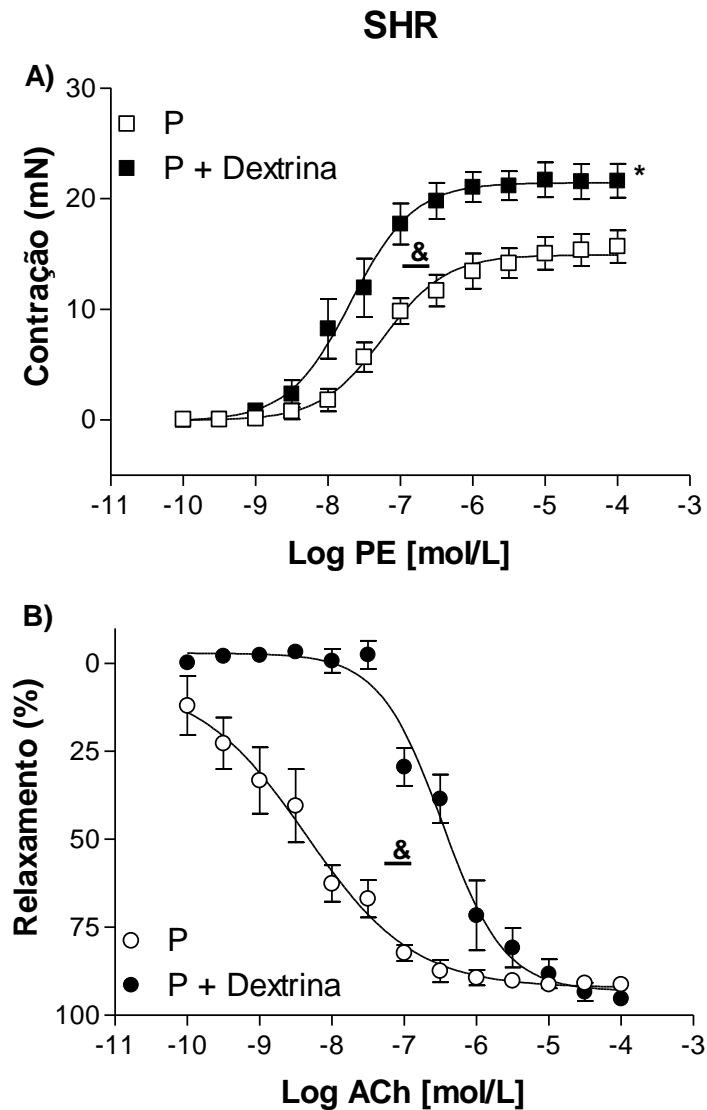


**Figura 16** - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas de SHR não prenhes (NP, em A) e prenhes (P, em B) na ausência ou na presença de Dextrina (10 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos ( $n = 5$ ). \*\* $p < 0,01$   $pD_2$  NP versus NP + Dextrina (Teste  $t$  de Student).



**Figura 17** - Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas de SHR não prenhes (NP, em A) e prenhes (P, em B) na ausência ou na presença de Dextrina (10 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos ( $n = 5$ ). &  $p < 0,01$   $pD_2$  NP versus NP + Dextrina (Teste  $t$  de Student).





**Figura 18** - Curvas concentração-efeito (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) para fenilefrina (PE, em A) e acetilcolina (ACh, em B) em anéis de aortas de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) prenhes (P) na ausência ou na presença de Dextrina (20 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos ( $n = 5$ ). \*\*  $p < 0,05$   $E_{max}$  P versus P + Dextrina; &  $p < 0,05$   $pD_2$  P versus P + Dextrina (Teste  $t$  de Student).

### 5.7 Quantificação de cavéolas endoteliais em aortas de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes

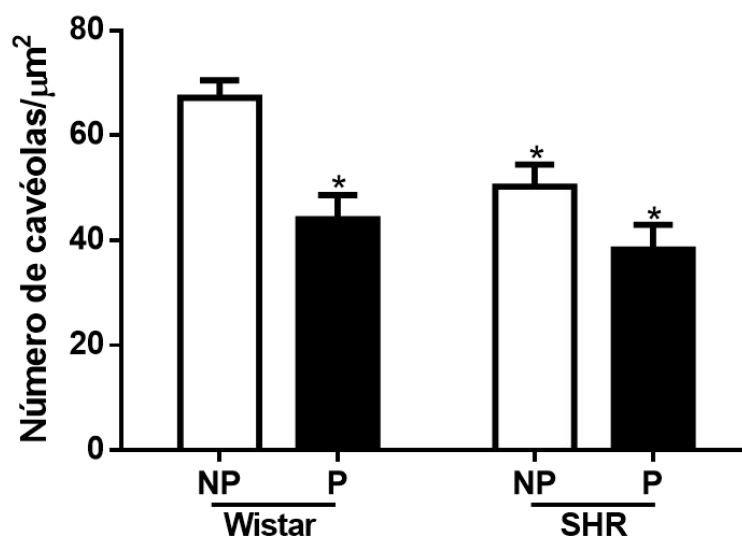
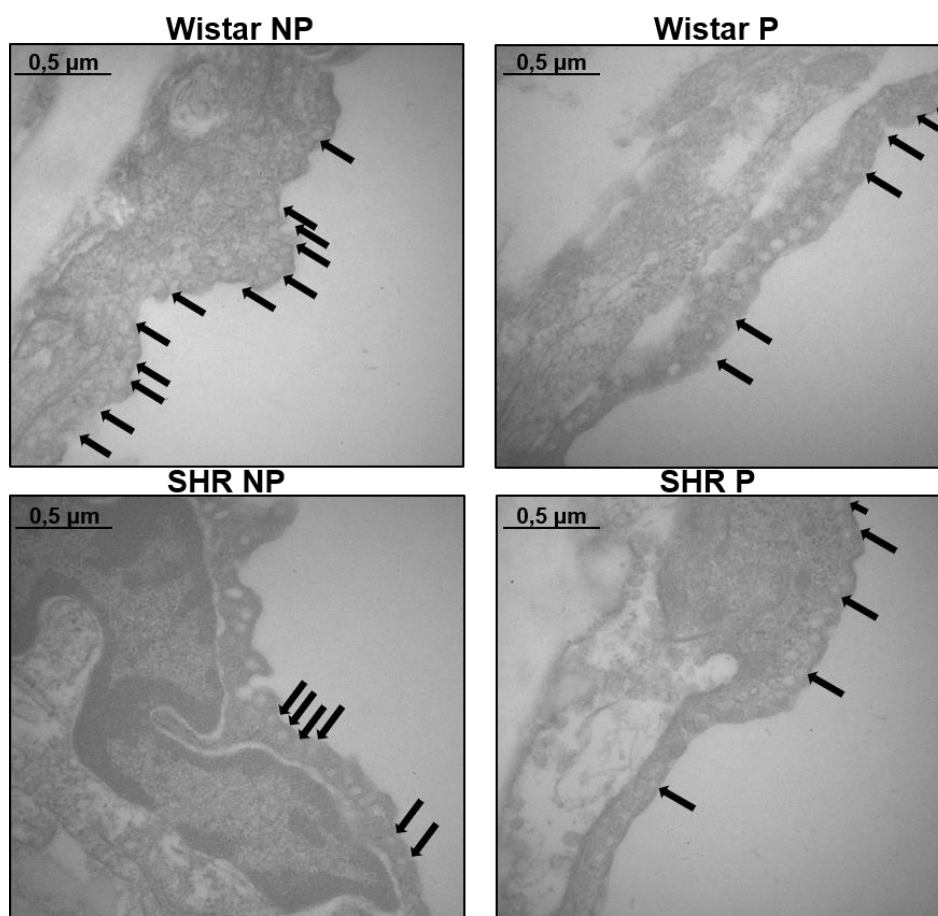
Avaliamos possíveis alterações no número de cavéolas endoteliais nos diferentes vasos sanguíneos (aorta e artéria mesentérica) dos grupos experimentais pela técnica de microscopia eletrônica.

Células endoteliais de aortas de SHR não prenhes apresentaram um número reduzido de cavéolas se comparado ao número de cavéolas de ratas Wistar (Figura 19).

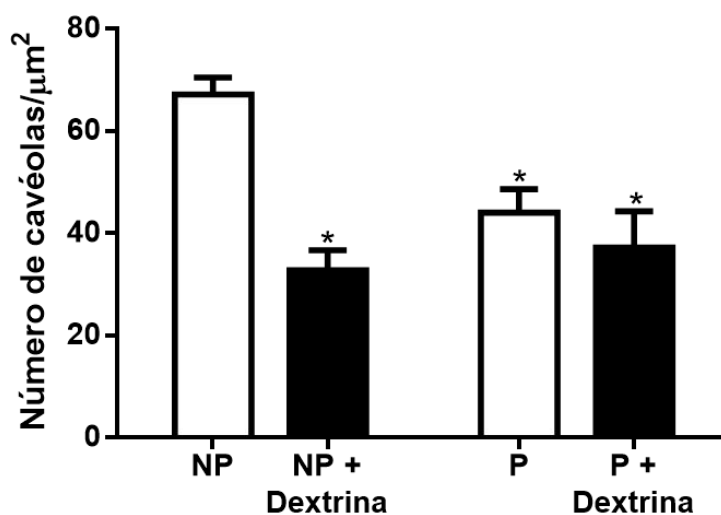
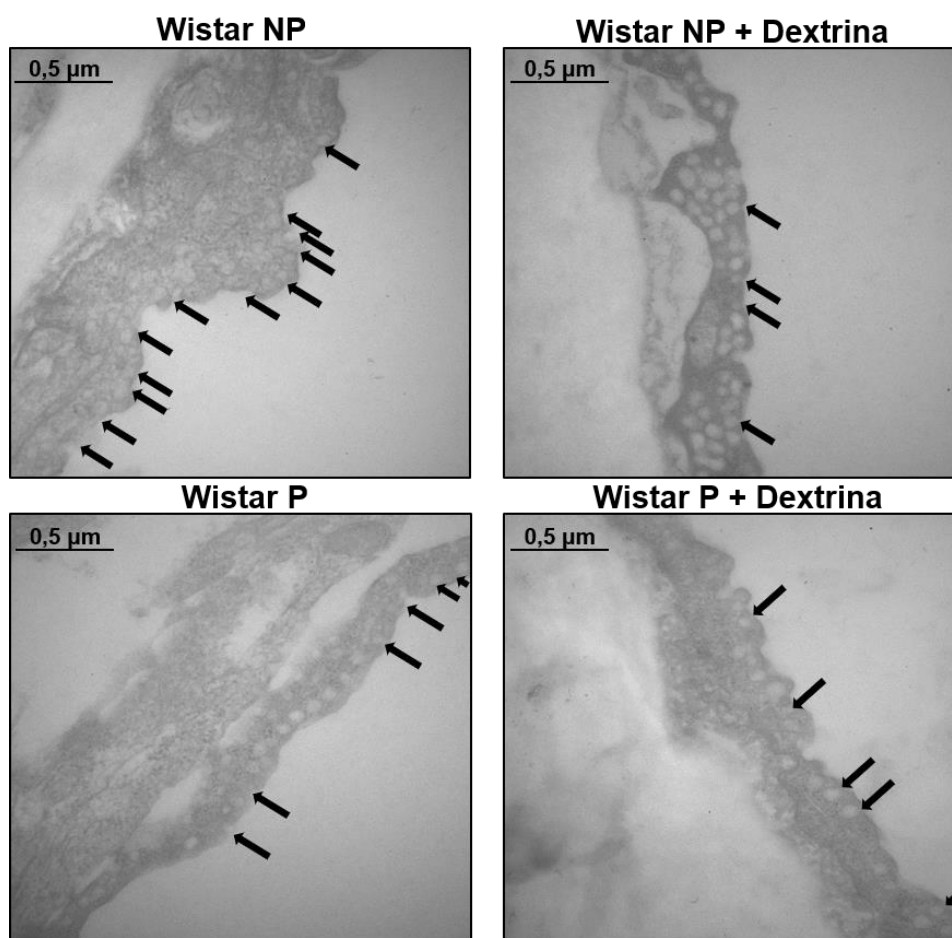
Ratas Wistar prenhes ( $44.00 \pm 4.65$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 4$ ) apresentaram uma menor quantidade de cavéolas endoteliais em aorta quando comparado com ratas Wistar não prenhes ( $67.20 \pm 3.29$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ). Porém, em aortas de SHR, a prenhez não alterou significativamente o número de cavéolas nestes vasos (SHR NP:  $50.20 \pm 4.21$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ; P:  $36.60 \pm 3.90$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.067$ , Figura 19).

O tratamento das aortas com dextrina reduziu o número de cavéolas em aortas de ratas Wistar não prenhes ( $32.80 \pm 3.87$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ), porém, interessante, não foi capaz de reduzir significativamente o número de cavéolas em aorta de ratas Wistar prenhes ( $37.25 \pm 7.07$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 4$ ) (Figura 20).

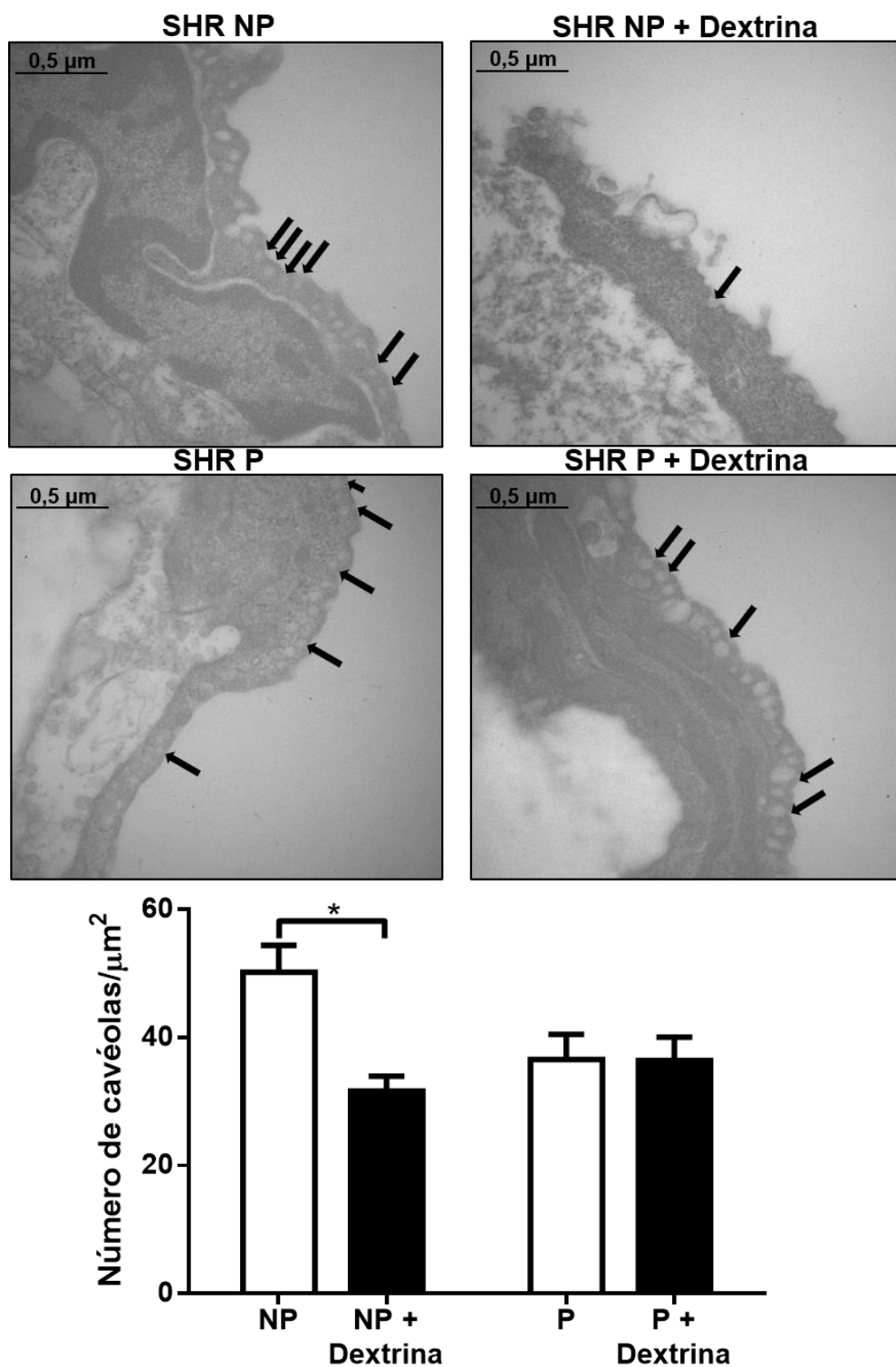
Em aortas de ratas hipertensas, a dextrina também foi capaz de reduzir o número de cavéolas endoteliais da aorta de SHR não prenhes ( $31.60 \pm 2.35$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ), mas não em aortas de SHR prenhes ( $36.40 \pm 3.66$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ) (Figura 21).



**Figura 19** - Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/ $\mu\text{m}^2$  em aorta de ratas Wistar e ratas espontaneamente hipertensas (SHR), não prenhes (NP, barras brancas) e prenhes (P, barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas ( $n = 4-5$ ) dos diferentes grupos. \* $p < 0,05$  entre Wistar NP *versus* demais grupos (ANOVA).



**Figura 20** - Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/μm<sup>2</sup> em aorta de ratas Wistar não prenhes (NP) e prenhes (P) na ausência (barras brancas) ou na presença (barras pretas) da dextrina (10 mmol/L). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \*p < 0,05 entre Wistar NP *versus* demais grupos (ANOVA).



**Figura 21** - Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/ $\mu\text{m}^2$  em aorta de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) não prenhes (NP) e prenhes (P) na ausência (barras brancas) ou na presença (barras pretas) da dextrina (10 mmol/L). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas ( $n = 5$ ) dos diferentes grupos. \* $p < 0,05$  entre Wistar NP *versus* Wistar NP + Dextrina (ANOVA).

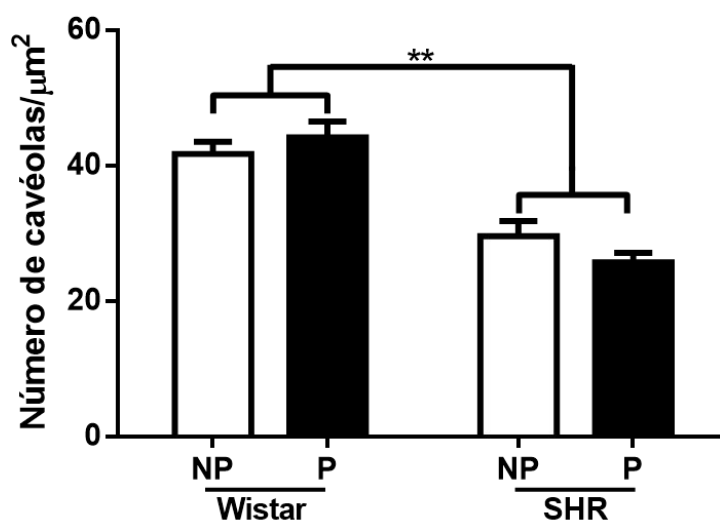
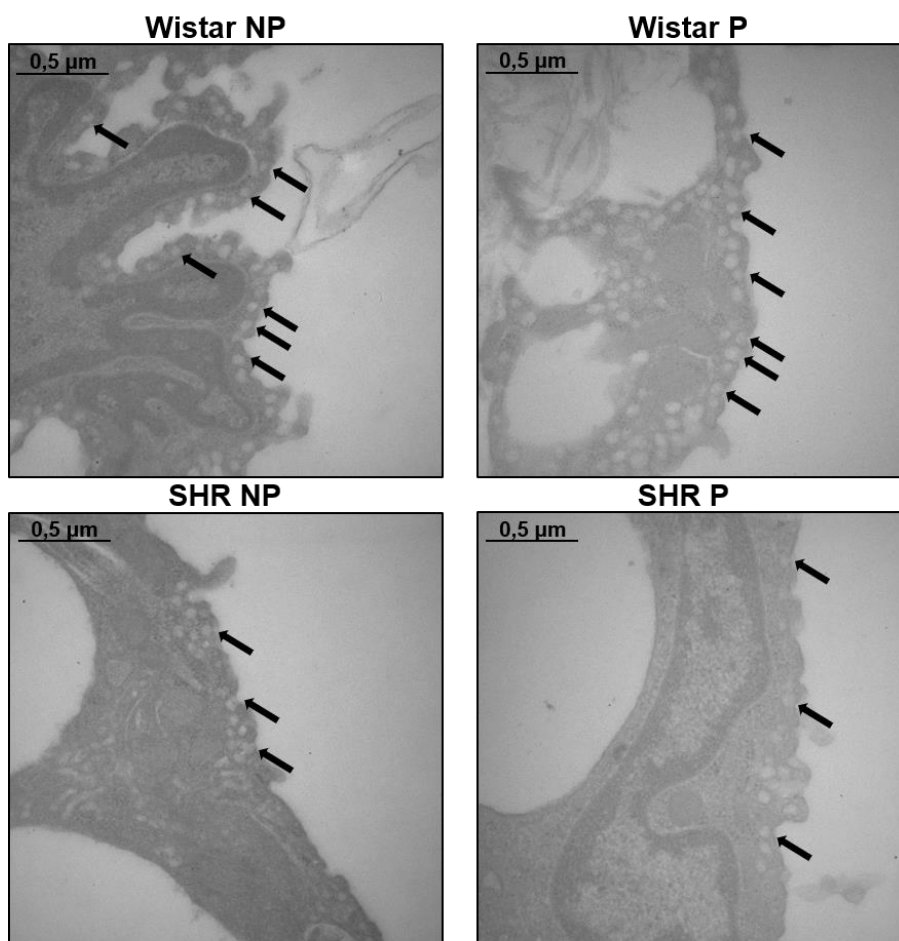
## **5.8 Quantificação de cavéolas endoteliais em artéria mesentérica de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes**

Observamos que artérias mesentéricas de ratas hipertensas não prenhes ou prenhes apresentam menor número de cavéolas endoteliais se comparadas as artérias mesentéricas de ratas normotensas não prenhes e prenhes, respectivamente (Figura 22).

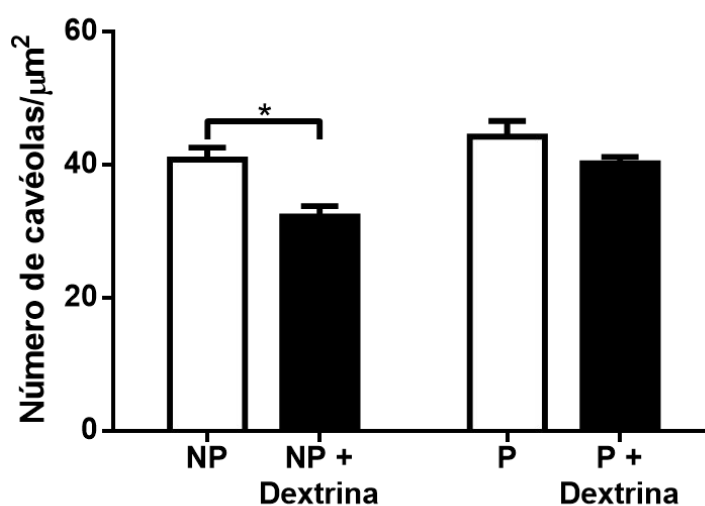
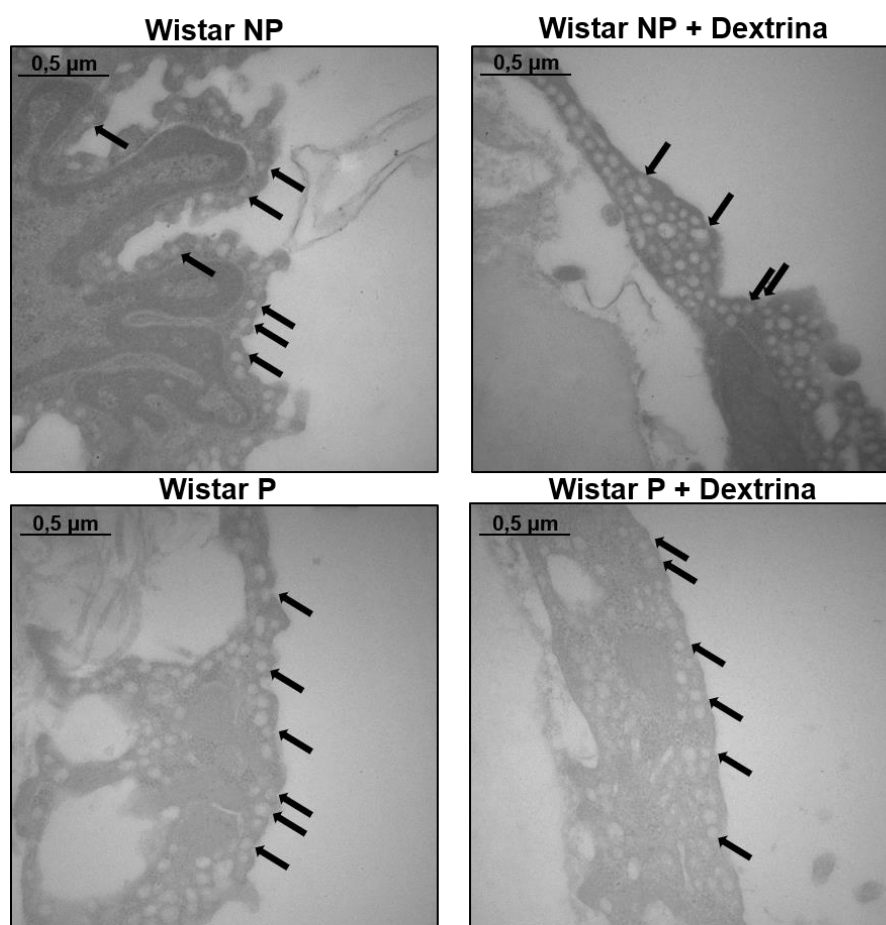
O número de cavéolas endoteliais das artérias mesentéricas de ratas Wistar prenhes ( $44.20 \pm 2.35$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ) não foi estatisticamente diferente do contado em artérias mesentéricas de ratas Wistar não prenhes ( $40.75 \pm 1.84$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ). Não observamos diferença no número de cavéolas endoteliais de artéria mesentérica entre os grupos SHR não prenhe ( $29.60 \pm 2.27$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ) e SHR prenhe ( $25.80 \pm 1.35$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ) (Figura 22).

O tratamento das artérias com dextrina foi capaz de reduzir o número de cavéolas em artéria mesentérica de ratas Wistar não prenhes ( $32.20 \pm 1.59$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ), porém não foi observada diferença dos valores encontrados em aortas de em ratas Wistar prenhes, na ausência ou presença de dextrina ( $40.20 \pm 0.96$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ) (Figura 23).

A presença da dextrina reduziu o número de cavéolas endoteliais em artéria mesentérica de SHR não prenhes ( $18.00 \pm 2.58$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ), mas não alterou em artéria mesentérica de SHR prenhes ( $24.40 \pm 1.69$  cavéolas/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ) (Figura 24).

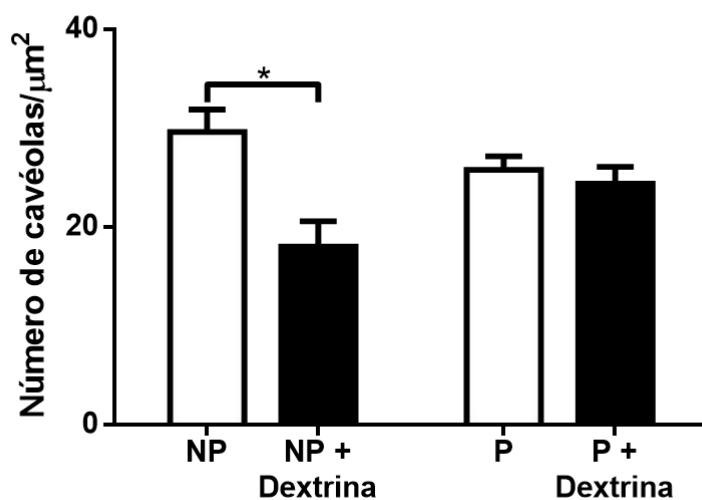
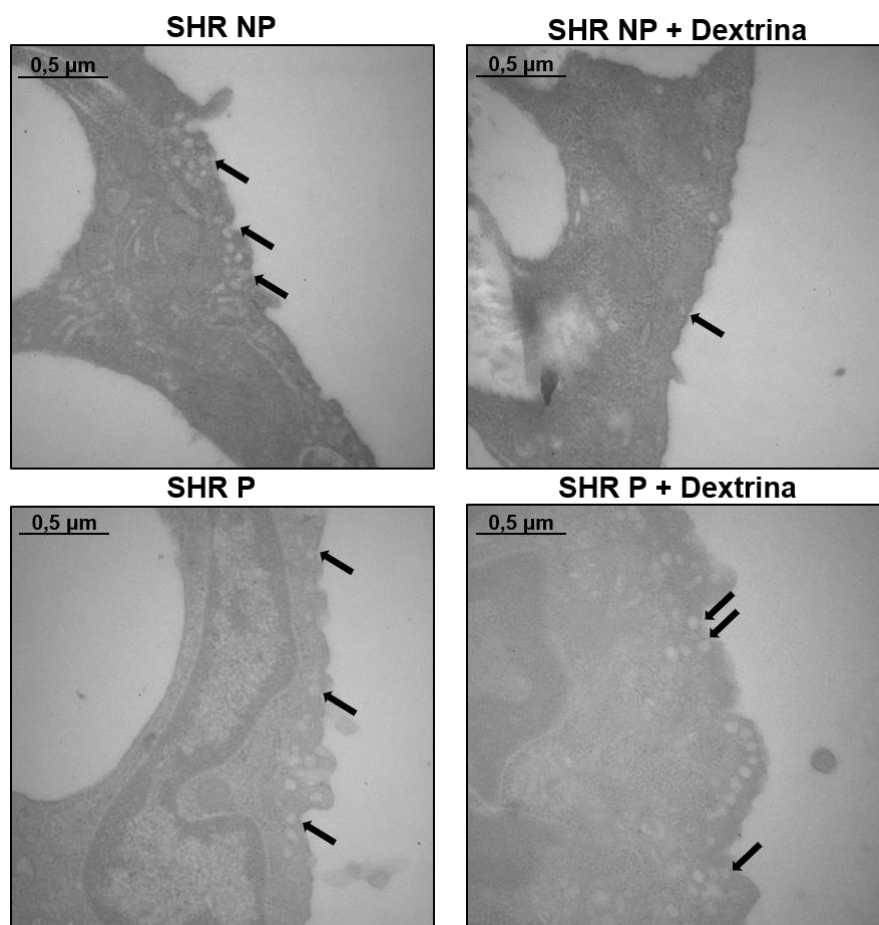


**Figura 22** – Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/ $\mu\text{m}^2$  em artéria mesentérica de ratas Wistar e ratas espontaneamente hipertensas (SHR), não prenhes (NP) e prenhes (P). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas ( $n = 5$ ) dos diferentes grupos. \*\* $p < 0,01$  entre Wistar NP e P *versus* SHR NP e P (ANOVA).



**Figura 23** – Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/ $\mu\text{m}^2$  em artéria mesentérica de ratas Wistar não prenhes (NP) e prenhes (P) na ausência ou na presença de dextrina (10 mmol/L). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \* $p < 0,05$  entre Wistar NP *versus* Wistar NP + Dextrina (ANOVA).





**Figura 24** – Fotomicrografias representativas (aumento de 50.000X) e quantificação do número de cavéolas/μm<sup>2</sup> em artéria mesentérica de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) não prenhes (NP) e prenhes (P) na ausência ou presença de dextrina (10 mmol/L). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em artéria mesentérica (n = 5) dos diferentes grupos. \*p < 0,05 entre Wistar NP *versus* Wistar NP + Dextrina (ANOVA).

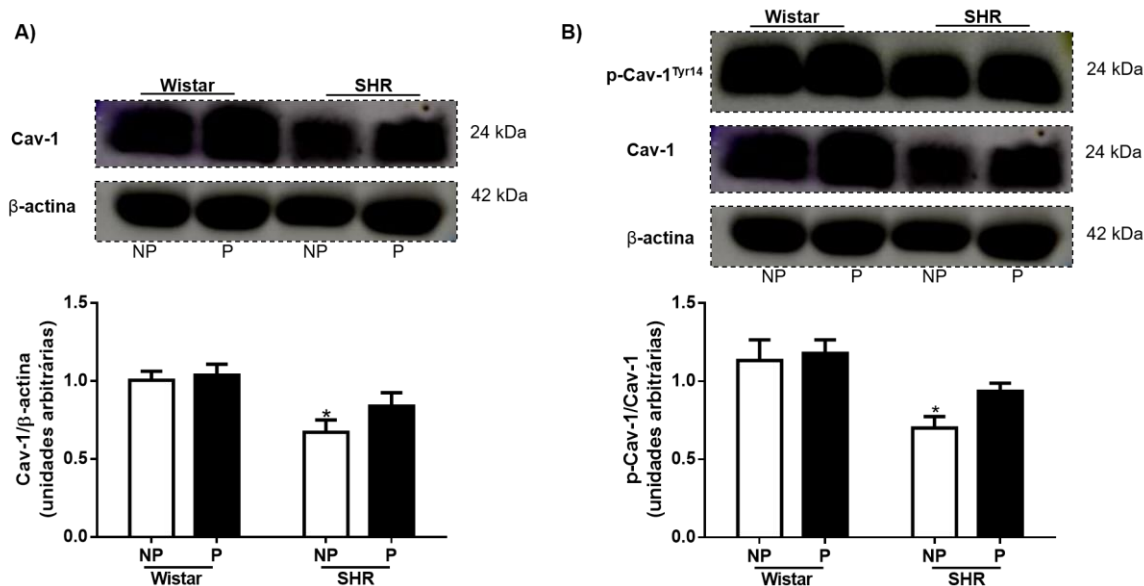
### **5.9 Expressão da caveolina-1 (Cav-1) e da fração fosforilada da Cav-1<sup>Tyr14</sup> (p-Cav-1<sup>Tyr14</sup>) em aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes**

Menor expressão de caveolina-1 (Cav-1) foi observada em homogenatos de aorta de ratas hipertensas não prenhes quando comparada com aortas de ratas normotensas não prenhes (Figura 25A).

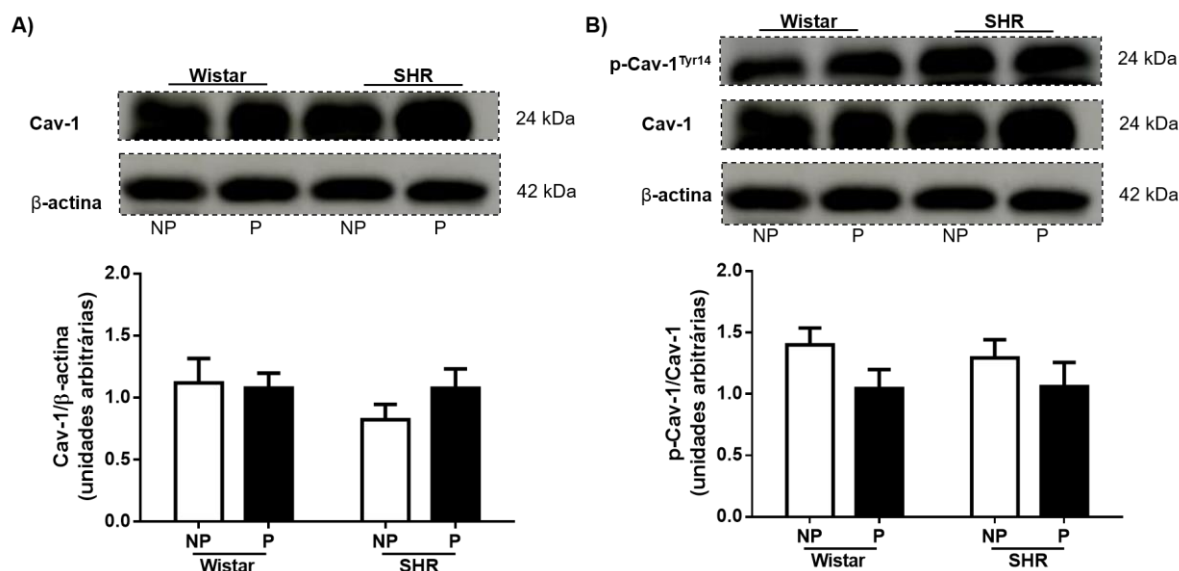
Não houve alteração na expressão de Cav-1 em homogenatos de aorta de ratas Wistar no final da prenhez (NP:  $1.00 \pm 0.05$  UA,  $n = 5$ ; P:  $1.03 \pm 0.06$  UA,  $n = 5$ , Figura 25A). A expressão de Cav-1 em homogenatos de aorta de SHR prenhes ( $0.83 \pm 0.05$  UA,  $n = 5$ ,  $p = 0.411$ ) não apresentou valores estatisticamente diferentes dos homogenatos de aorta de SHR não prenhes ( $0.67 \pm 0.07$  UA,  $n = 5$ , Figura 25A), apesar de um aumento poder ser observado.

A fração fosforilada da Cav-1<sup>Tyr14</sup> (p-Cav-1<sup>Tyr14</sup>) normalizada pela fração total da Cav-1 estava reduzida em homogenatos de aorta de SHR NP quando comparada com aorta de Wistar NP. A expressão da p-Cav-1<sup>Tyr14</sup> em homogenatos de aorta não foi alterada pela prenhez em ratas normotensas (NP:  $1.13 \pm 0.10$  UA,  $n = 5$ ; P:  $1.17 \pm 0.08$  UA,  $n = 5$ ) e em SHR (NP:  $0.70 \pm 0.07$  UA,  $n = 5$ ; P:  $0.93 \pm 0.05$  UA,  $n = 5$ ), (Figura 25B).

Em homogenatos de leitões mesentéricos, a expressão da Cav-1 (Figura 26A) não foi diferente entre os grupos estudados (Wistar NP:  $1.11 \pm 0.19$  UA,  $n = 5$ ; P:  $1.07 \pm 0.12$  UA,  $n = 5$ ; SHR NP:  $0.82 \pm 0.12$  UA,  $n = 5$ ; P:  $1.07 \pm 0.15$  UA,  $n = 5$ ), bem como a expressão da p-Cav-1<sup>Tyr14</sup> (Wistar NP:  $1.40 \pm 0.13$  UA,  $n = 5$ ; P:  $1.04 \pm 0.15$  UA,  $n = 5$ ; SHR NP:  $1.29 \pm 0.14$  UA,  $n = 5$ ; P:  $1.06 \pm 0.19$  UA,  $n = 5$ ) (Figura 26B).



**Figura 25** - Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica da caveolina-1 (Cav-1)/  $\beta$ -actina (A) e p-Cav-1<sup>Tyr14</sup>/Cav-1 (B) em homogenatos de aorta de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 5) dos diferentes grupos. \*  $p < 0,05$  SHR NP versus Wistar NP e P (ANOVA).



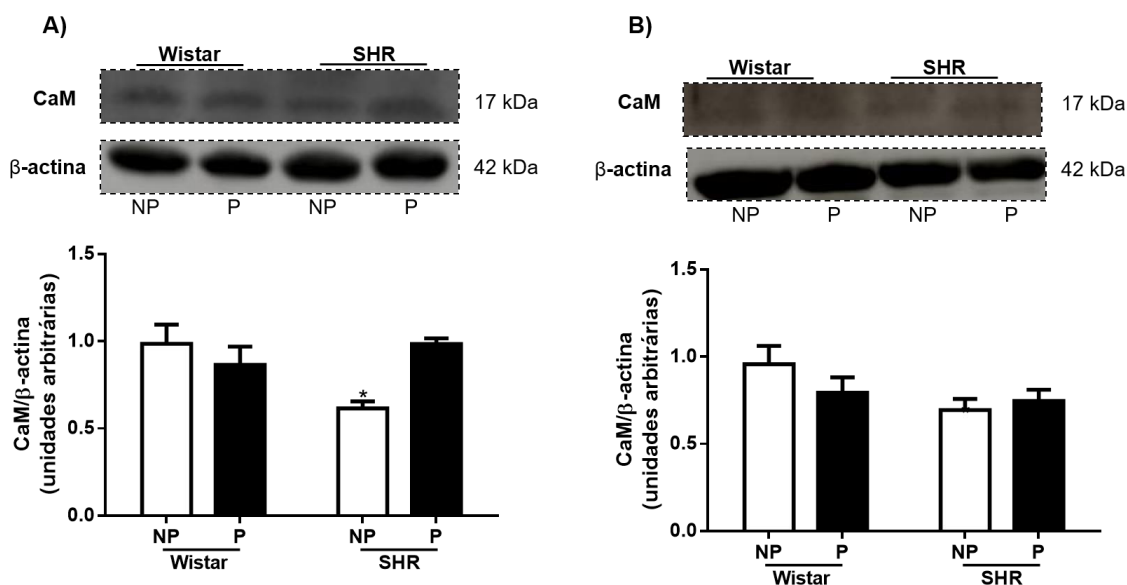
**Figura 26** - Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica da caveolina-1 (Cav-1)/  $\beta$ -actina (A) e p-Cav-1<sup>Tyr14</sup>/Cav-1 (B) em homogenatos de leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico (n = 5) dos diferentes grupos.

## 5.10 Expressão da calmodulina (CaM) em aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes

A expressão da CaM está diminuída em homogenatos de aorta de SHR não prenhes quando comparada com de ratas normotensas não prenhes (Figura 27A).

A prenhez não alterou a expressão da CaM avaliada em homogenatos de aorta de ratas normotensas (NP:  $0.98 \pm 0.11$  UA,  $n = 5$ ; P:  $0.86 \pm 0.10$  UA,  $n = 5$ ) e de ratas hipertensas (NP:  $0.61 \pm 0.04$  UA,  $n = 5$ ; P:  $0.98 \pm 0.04$  UA,  $n = 5$ ) (Figura 27A).

Em homogenatos de leito mesentérico, a expressão da CaM não foi diferente entre as linhagens e a prenhez não alterou a expressão desta proteína alvo (Wistar NP:  $0.95 \pm 0.10$  UA,  $n = 5$ ; P:  $0.79 \pm 0.08$  UA,  $n = 5$ ; SHR NP:  $0.69 \pm 0.06$  UA,  $n = 5$ ; P:  $0.74 \pm 0.06$  UA,  $n = 5$ ) (Figura 27B).

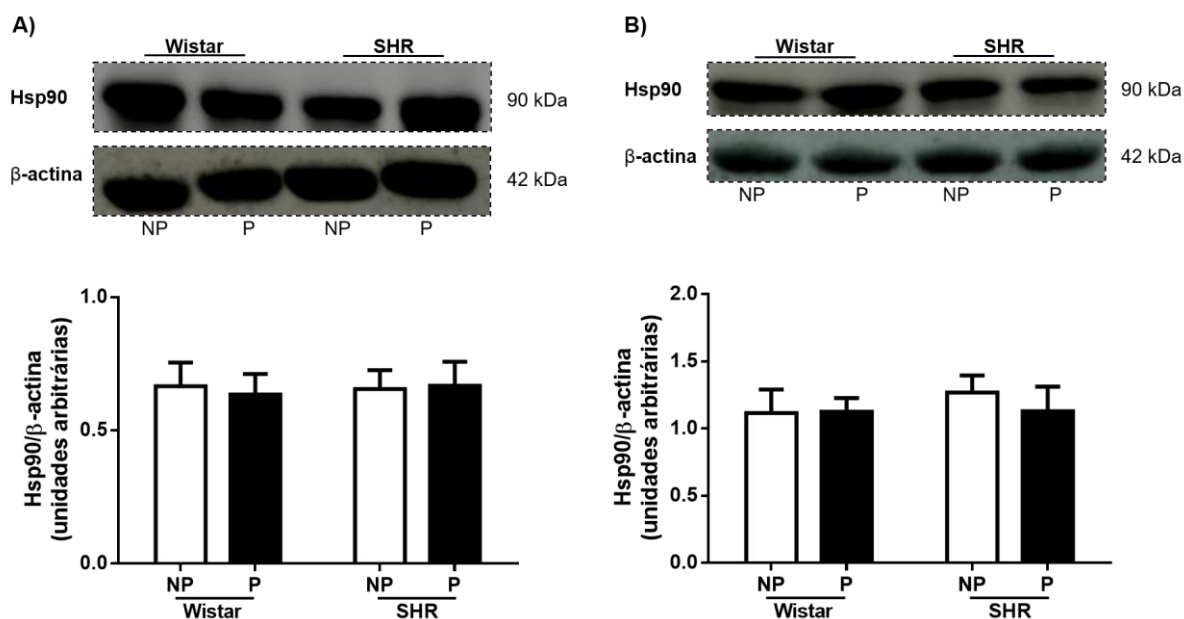


**Figura 27** - Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica da calmodulina (CaM)/  $\beta$ -actina em homogenatos de aorta (em A) e de leito mesentérico (em B) de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico ( $n = 5$ ) dos diferentes grupos. \*  $p < 0,05$  SHR NP versus Wistar NP (ANOVA).

### 5.11 Expressão da Hsp90 em aorta e leito mesentérico de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes

A expressão de proteínas Hsp90 não está alterada em vasos de ratas SHR não prenhes. Observamos que a expressão da Hsp90 foi semelhante entre homogenatos de aorta de ratas não prenhes e prenhes Wistar (NP:  $0.66 \pm 0.08$  UA,  $n = 6$ ; P:  $0.63 \pm 0.07$  UA,  $n = 6$ ) e SHR (NP:  $0.65 \pm 0.07$  UA,  $n = 5$ ; P:  $0.66 \pm 0.08$  UA,  $n = 5$ ) (Figura 28A).

Em homogenatos de leito mesentérico a expressão da Hsp90 (Figura 28B) também não foi alterada pela prenhez em ratas Wistar (NP:  $1.11 \pm 0.17$  UA,  $n = 6$ ; P:  $1.12 \pm 0.10$  UA,  $n = 6$ ) ou SHR (NP:  $0.65 \pm 0.07$  UA,  $n = 5$ ; P:  $0.66 \pm 0.08$  UA,  $n = 5$ ), não prenhes e prenhes.



**Figura 28** - Imagens das bandas e quantificação da expressão proteica da Hsp90/  $\beta$ -actina em homogenatos de aorta (em A) e de leito mesentérico (em B) de ratas Wistar e SHR, não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em leito mesentérico ( $n = 5-6$ ) dos diferentes grupos.

***DISCUSSÃO***

## 6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo verificamos que a prenhez altera a modificação pós-traducional que regula a atividade da eNOS em artérias, reduzindo a O-GlcNAcilação da eNOS. No entanto, as proteínas Cav-1, CaM e Hsp90 não estariam envolvidas na maior ativação da eNOS em artérias de ratas prenhes.

Na primeira parte de nosso estudo, nós demonstramos, pela primeira vez, que a expressão das proteínas O-GlcNAcilas está reduzida em vasos sanguíneos, aorta e artéria mesentérica, de ratas normotensas e hipertensas prenhes devido à alteração da atividade da OGA. A atividade da OGA está aumentada em aorta e em artéria mesentérica de ratas Wistar prenhes e aumentada em artéria mesentérica, mas diminuída em aorta de SHR prenhes se comparadas as artérias dos respectivos controles.

Estes resultados sugerem que a O-GlcNAcilação da eNOS estaria reduzida, podendo contribuir para o aumento da fosforilação da eNOS<sup>Ser1177</sup> em artérias de ratas prenhes, como demonstrado anteriormente pelo nosso grupo (ZANCHETA *et al.*, 2015) contribuindo assim para uma menor reatividade vascular à PE, como observado no final da prenhez de ratas.

Uma maior atenção tem sido direcionada a O-GlcNAcilação pois esta modificação pós-traducional é capaz de alterar a atividade de proteínas do núcleo e do citoplasma de diferentes células, incluindo as do músculo liso vascular e células endoteliais (HART; HOUSLEY; SLAWSON, 2007; HART *et al.*, 1989; TRAXINGER; MARSHALL, 1991). Já foi demonstrado que o aumento da O-GlcNAcilação da eNOS inibe a fosforilação da eNOS<sup>Ser1177</sup> e síntese de NO, levando a disfunção vascular e endotelial em ratos diabéticos (DU *et al.*, 2001) e em ratos hipertensos (LIMA *et al.*, 2009).

Considerando que a disfunção endotelial é uma das principais características da pré-eclâmpsia, na gravidez normal, o papel do NO tem sido considerado de grande importância para manutenção do tônus vascular periférico e redução da pressão arterial. A compreensão dos mecanismos envolvidos nas vias de tradução que melhoram a biodisponibilidade do NO na gravidez poderiam fornecer

conhecimento científico para propormos novas abordagens terapêuticas para prevenção ou tratamento da pré-eclâmpsia.

O aumento da O-GlcNAcilação pode também induzir a disfunção vascular por meio da superprodução de ânion superóxido (LIMA *et al.*, 2012) via ativação de NAD(P)H oxidase na aorta de ratos Wistar (SOUZA-SILVA *et al.*, 2018). Já mostramos que a prenhez diminui as ERO e a expressão das isoformas de NAD(P)H oxidase: NOX1, NOX2 e NOX4 na aorta de SHR (TROIANO *et al.*, 2016). Assim, é possível que a produção reduzida de ERO na aorta de SHR prenhes possa ser também devido à redução das proteínas vasculares modificadas por O-GlcNAcilação e pelas isoformas de NAD(P)H oxidase menos ativas.

A prenhez não altera a expressão de OGT e OGA na aorta e no leito mesentérico de ratos Wistar (Figuras 3 e 4), mas aumenta significativamente a atividade da OGA nesses vasos sanguíneos (Figuras 5 e 6). Dado que a OGA remove a ligação de O-GlcNAcilação de proteínas, estes resultados sugerem que a diminuição da expressão do conteúdo proteico O-GlcNAcilação em vasos sanguíneos de ratos Wistar prenhes está diretamente relacionada com o aumento da atividade da OGA, sugerindo uma ligação entre este mecanismo e maior atividade da eNOS nesses tecidos.

Embora a expressão das proteínas O-GlcNAcilação tenha diminuído na aorta e no leito mesentérico de SHR prenhes quando comparada com SHR não prenhes, o mecanismo que leva a esta alteração parece ser diferente nessas artérias. Na aorta de SHR prenhes, a expressão de OGT e OGA não foram alteradas (Figura 3), mas a atividade da OGA foi reduzida (Figura 5). Já no leito mesentérico, apesar de não observarmos diferenças na expressão de OGT e de OGA, a atividade de OGA foi aumentada (Figuras 4 e 6).

Diante das alterações observadas na atividade da OGA nos diferentes vasos sanguíneos, nós avaliamos se a inibição da enzima OGA poderia modificar a reatividade vascular para PE no final da prenhez em aortas e artérias mesentéricas, realizando experimentos funcionais, com o PugNAc, um inibidor da OGA. Em aortas de ratos normotensos, o tratamento com o PugNAc e consequente aumento da O-GlcNAcilação, levou a uma diminuição da fosforilação de eNOS<sup>Ser1177</sup> e Akt<sup>Ser473</sup> (LIMA *et al.*, 2008).



A inibição da OGA foi capaz de aumentar o efeito máximo das curvas concentração-resposta de PE em ambos os vasos de ratas Wistar prenhes, mas não em ratas Wistar não prenhes sugerindo que a atividade do OGA está envolvida na menor resposta contrátil da reatividade à PE observada nos vasos sanguíneos de ratas Wistar prenhes. Nas aortas e nas artérias mesentéricas de resistência incubadas com PugNAc de ratas Wistar prenhes, nós observamos uma modulação menos dependente de endotélio-eNOS na reatividade à PE, sugerindo que a atividade da eNOS esteja menos ativa na ausência da OGA devido a um aumento da O-GlcNAcilação das proteínas vasculares, como a eNOS, prejudicando a produção de NO e seu efeito na modulação da vasoconstrição à PE. Como relatado anteriormente, a dieta rica em gordura aumenta a O-GlcNAcilação cerebrovascular na artéria basilar de ratos Wistar e esta modificação contribui para o aumento das respostas contráteis a alguns agonistas: 5-HT (serotonina) e U46619 (análogo do tromboxano A2) (LIMA *et al.*, 2016). Portanto, nossos resultados nos levam a acreditar que a OGA é a chave no mecanismo de redução do conteúdo de proteínas O-GlcNAcilas em vasos sanguíneos durante o final da prenhez de ratas normotensas.

Em aortas de SHR prenhes, a atividade da OGA foi reduzida, e a sua inibição com PugNAc em experimentos funcionais vasculares não foi capaz de alterar as respostas contráteis à PE. Este achado sugere que a atividade da OGT poderia estar diminuída em aorta de SHR prenhes, embora a expressão de OGT não seja alterada neste vaso. Assim, como não houve diferença nas curvas concentração-resposta para PE em aortas incubadas com o veículo ou com PugNAc este fato poderia ser explicado pela ausência de formação de proteínas O-GlcNAcilas por OGT. Na artéria mesentérica de resistência, também foi observada diminuição da expressão das proteínas O-GlcNAcilas e, embora a atividade de OGA esteja aumentada, em experimentos funcionais, o PugNAc não foi capaz de alterar a resposta vascular à PE.

Assim, os estudos funcionais nos mostraram que a inibição da OGA, foi capaz de reverter a reatividade reduzida de vasos de ratas prenhes somente em ratas normotensas. Estes resultados nos levam a acreditar que a OGA desempenha papel importante no mecanismo de redução do conteúdo de proteínas O-GlcNAcilas em

artérias durante o final da prenhez de ratas normotensas, e parcialmente em artérias de SHR prenhes. É possível que o PugNAc esteja prejudicando a produção de NO e seu efeito anti-contrátil na contração induzida por PE em artérias de ratas Wistar prenhes. Nossa sugestão é sustentada pela observação de que em aortas e artérias mesentéricas tratadas com PugNAc, as curvas na presença de L-NAME (inibidor de NOS) e as curvas com ausência de endotélio foram semelhantes as curvas controle (Figura 9) evidenciando que a inibição da atividade da OGA pelo PugNAc leva à O-GlcNAcilação da eNOS, tornando-a disfuncional. Estes resultados sugerem um mecanismo importante entre maior atividade da OGA, maior atividade da eNOS e hiporreatividade à PE em artérias de ratas Wistar prenhes.

Numa segunda parte de nosso estudo, nós avaliamos se a prenhez alteraria algumas proteínas que interagem diretamente com a eNOS em vasos de ratas normotensas e hipertensas.

A cavéola tem sido descrita como uma importante estrutura nas células vasculares, pois nela é encontrada algumas proteínas que participam de vias de sinalização da eNOS. A fim de avaliarmos o papel das cavéolas sobre a contração induzida por PE e o relaxamento induzido por ACh, realizamos estudos funcionais de reatividade em aortas de ratas prenhes e não prenhes, Wistar e SHR na presença da droga dextrina, considerada uma droga que desorganiza a estrutura das cavéolas (LINDER *et al.*, 2005). Nós observamos que a dextrina aumentou a reatividade à PE em aortas de ratas normotensas e hipertensas não prenhes (Figuras 13A e 16A). Estudos prévios demonstraram que a dextrina é capaz de aumentar a contração vascular estimulada por uma alta concentração de potássio por um mecanismo associado a menor produção de NO, via eNOS em artérias femorais de ratos Wistar (AL-BRAKATI *et al.*, 2015). Linder *et al.* (2005) demonstraram que aortas de ratos Sprague-Dawley incubadas com dextrina apresentam menor relaxamento induzido por ACh. A incubação prévia de aortas de ratos normotensos e hipertensos 2 rins, 1 clipe (2K-1C) com dextrina leva ao prejuízo no relaxamento induzido por ACh (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, a dextrina deslocou para a direita as curvas concentração-efeito para ACh, reduzindo assim a potência da ACh apenas em vasos de ratas normotensas e hipertensas não prenhes (Figuras 12A e 14A). Estes dados reforçam

a importância da estabilidade das cavéolas para a localização e atividade da eNOS em vasos sanguíneos de ratos normotensos ou hipertensos. Interessantemente, em aortas de ratas prenhes, normotensas e hipertensas, não foi observado efeito da dextrina sobre a contração pela PE e relaxamento pela ACh quando usada na mesma concentração (10 mmol/L) que a usada em artérias de ratas não prenhes. Foi necessário a concentração duas vezes maior de dextrina (20 mmol/L) para observarmos aumento das respostas contráteis à PE e prejuízo no relaxamento à ACh em aortas de ratas prenhes, normotensas e hipertensas (Figuras 15 e 18). Estes resultados sugerem que a prenhez é capaz de aumentar a resistência das cavéolas ao efeito da dextrina, ou que a atividade da eNOS em vasos de ratas prenhes seria menos dependente da estabilidade das cavéolas.

A partir destes resultados, investigamos se a prenhez alteraria o número de cavéolas presentes no endotélio de aortas e de artérias mesentéricas de ratas normotensas e hipertensas. Utilizando microscopia eletrônica, observamos primeiramente que o número de cavéolas endoteliais em aorta e artéria mesentérica de ratas hipertensas está reduzido em relação ao número de cavéolas observados em artérias de ratas normotensas (Figuras 19 e 22). Estes resultados corroboram achados prévios de nosso grupo que mostram a redução no número de cavéolas em aorta e artéria mesentérica de SHR machos se comparados às artérias de ratos normotensos Wistar (POTJE *et al.*, 2019). Ratos hipertensos 2K-1C também apresentaram reduzido número de cavéolas endoteliais e do músculo liso da aorta quando comparados aos ratos normotensos (RODRIGUES *et al.*, 2007, 2010). Juntos, os resultados sugerem que a disfunção endotelial e/ou vascular na hipertensão poderia ser associada à quantidade reduzida de cavéolas nestes tecidos.

Nossos achados mostraram que a prenhez reduz significativamente o número de cavéolas endoteliais em aorta de ratas Wistar (Figura 20), mas este efeito parece ser dependente do tipo de vaso, uma vez que não foi observado em artéria mesentérica (Figura 23). SHR prenhes não apresentaram diferenças significativas no número de cavéolas endoteliais em aorta e artéria mesentérica (Figuras 21 e 24) quando comparado com SHR não prenhes. Como descrevemos anteriormente, o número de cavéolas já é reduzido nas artérias de SHR não prenhes e a prenhez não

foi capaz de reduzir ainda mais o número de cavéolas endoteliais encontrado nestes tecidos. A dextrina reduziu o número de cavéolas em artérias de ratas não prenhes Wistar, mas não alterou o menor número de cavéolas encontrados em artérias de ratas prenhes, Wistar ou SHR. Não entendemos até o momento como esta alteração no número de cavéolas observado em aortas de ratas prenhes poderia explicar os resultados dos estudos funcionais. Associar o reduzido número de cavéolas encontrado em aortas de ratas prenhes à observação que a dextrina 10 mmol/L não foi capaz de alterar o número de cavéolas ou a menor reatividade vascular à PE e ACh em aorta e de ratas Wistar prenhes e de SHR prenhes, reforça a sugestão que as cavéolas endoteliais em artérias de ratas prenhes seriam mais resistentes ao efeito da dextrina. Nossos resultados mostraram que apenas a concentração de 20 mmol/L foi capaz de alterar as curvas concentração-efeito para PE e ACh em artérias de ratas prenhes. No entanto, o menor número de cavéolas não poderia ser associado a maior atividade da eNOS encontrada em artérias de ratas prenhes (BALLEJO *et al.*, 2002; ZANCHETA *et al.*, 2015).

A fim de tentarmos entender estes mecanismos, avaliamos possíveis alterações na interação entre as proteínas que controlam a atividade da eNOS em artérias de ratas prenhes. A Cav-1 é a principal proteína estrutural da cavéola e está intimamente relacionada com a atividade da eNOS. Ao avaliarmos a expressão da Cav-1 observamos que ratas hipertensas apresentaram uma redução na expressão de Cav-1 em aortas quando comparada com ratas normotensas. Este resultado reforça dados da literatura que mostram uma redução da expressão de Cav-1 em aortas de SHR machos (CRISTOFARO; YALLA; SULLIVAN, 2012; PIECH *et al.*, 2003; SANCHÉZ *et al.*, 2006; VERA *et al.*, 2007) e que a redução do número de cavéolas seria acompanhada pela redução da expressão de Cav-1. A expressão de Cav-1 não está alterada em artérias de SHR prenhes, mas também não foi diferente se comparada com a expressão em aortas de ratas Wistar não prenhes ou prenhes, caracterizando uma possível reversão da menor expressão de Cav-1 em aortas de SHR (Figura 25A). Em artéria mesentérica a relação das cavéolas/ Cav-1 parece não estar alterada durante a prenhez de ratas normotensas e hipertensas (Figura 26A).

A fosforilação da Cav-1<sup>Tyr14</sup> leva a sua ligação com a eNOS e consequentemente inativação desta enzima. No entanto tem sido sugerido que este mecanismo seja compensatório ao aumento da fosforilação da eNOS<sup>Ser1177</sup> via NO/Src, ou seja, o aumento de NO decorrente do aumento da fosforilação da eNOS<sup>Ser1177</sup> ativaria a p-Src que levaria a fosforilação da Cav-1<sup>Tyr14</sup> que por sua vez aumenta a ligação/inibição com a eNOS (CHEN *et al.*, 2012). A fosforilação da Cav-1<sup>Tyr14</sup> estava reduzida em aorta de SHR não prenhes quando comparada com Wistar não prenhes e prenhes, podendo sugerir que essa menor atividade da Cav-1 seja consequente a menor produção de NO (Figura 25B). Apesar da expressão não ser diferente entre em aortas de SHR não prenhes e SHR prenhes, a expressão entre SHR prenhes e Wistar não prenhes também não foi diferente, sugerindo uma possível reversão da alteração em artérias de SHR prenhes.

A expressão da CaM em aortas foi reduzida em ratas hipertensas não prenhes quando comparado com ratas normotensas não prenhes, corroborando os resultados que demonstram que machos SHR apresentam uma redução da expressão de CaM quando comparados com ratos normotensos (CRISTOFARO; YALLA; SULLIVAN, 2012; PIECH *et al.*, 2003; SANCHÉZ *et al.*, 2006; VERA *et al.*, 2007). A prenhez não foi capaz de alterar a expressão de CaM em artérias de ratas normotensas e hipertensas (Figura 27A e B). Diferentes estudos demonstraram que o relaxamento induzido por ACh não estava alterada ao final da prenhez de ratas Wistar (BALLEJO *et al.*, 2002; ZANCHETA *et al.*, 2015), sugerindo que o aumento do complexo Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina não estaria envolvido na ativação da eNOS pela prenhez.

A ligação da Hsp90 a eNOS estimula a sua atividade, aumentando as funções catalíticas da enzima e mantendo o equilíbrio entre NO produzido pela eNOS e ânion superóxido (BROUET *et al.*, 2001; PRITCHARD JÚNIOR *et al.*, 2001). Experimentos em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e em aorta isolada de ratos demonstraram que a atividade da eNOS é aumentada pela formação do complexo entre eNOS e Hsp90, levando ao aumento da produção de NO (WANG *et al.*, 2009). Foi demonstrada que a relação entre a expressão de Hsp90 e eNOS fosforilada nos tecidos da aorta de SHR machos é menor se comparada as preparações de ratos normotensos (WKY) e que esta relação pode

ser aumentada pelo tratamento de SHR com nitrito de sódio (LING *et al.*, 2016). Até o momento, nossos resultados mostraram que a expressão da Hsp90 total não está alterada em artérias de SHR não prenhes quando comparada as artérias de ratas normotensas e que a prenhes não altera a expressão desta proteína nas artérias de ratas normotensas e hipertensas (Figura 28A e B), sugerindo que a Hsp90 não seria um mecanismo importante para a ativação da eNOS em artérias de ratas prenhes. No entanto, estudos prévios demonstraram papel específico das subunidades da Hsp90 sobre a atividade da eNOS, enquanto a Hsp90 $\alpha$  leva à fosforilação Akt, que induz a fosforilação da eNOS<sup>Ser1177</sup>, aumentando a produção de NO e Hsp90 $\beta$  leva à fosforilação da eNOS<sup>Thr495</sup>, promovendo produção de ânion superóxido (TANAKA *et al.*, 2015). Novos estudos deverão ser feitos para avaliarmos possíveis alterações na expressão e atividade da Hsp90 $\alpha$  em artérias de ratas prenhes.

**CONCLUSÃO**

## 7 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostra que as proteínas O-GlcNAcizadas estão diminuídas na aorta e na artéria mesentérica de resistência das ratas normotensas e hipertensas prenhes, sugerindo contribuição na maior fosforilação da eNOS e, conseqüentemente, da biodisponibilidade do NO. Além disso, a atividade aumentada da OGA parece desempenhar um papel fundamental na modulação da hiporreatividade vascular da PE observada em ratas Wistar prenhes, enquanto em artérias de SHR prenhes, nós especulamos que a OGT parece estar envolvida com a redução da O-GlcNAcilação das proteínas vasculares. As proteínas Cav-1, CaM e Hsp90 parecem não estar alteradas no final da prenhez e possivelmente não estariam contribuindo para uma maior biodisponibilidade de NO nos vasos sanguíneos estudados de ratas Wistar e SHR.



# ***REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

- AL-BRAKATI, A. Y. *et al.* Caveolar disruption causes contraction of rat femoral arteries via reduced basal NO release and subsequent closure of BKCa channels. **PeerJ.**, v. 3, p. e966, May 2015. DOI: 10.7717/peerj.966.
- ALOAMAKA, C. P. *et al.* Mechanism of pregnancy induced attenuation of contraction to phenylephrine in rat aorta. **Exp. Physiol.**, v. 78, p. 403-410, May 1993.
- AYAJIKI, K. *et al.* Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. **Circ. Res.**, v. 78, n. 5, p. 750-758, May 1996.
- BALLEJO, G. *et al.* Pregnancy-associated increase in rat systemic arteries endothelial nitric oxide production diminishes vasoconstrictor but does not enhance vasodilator responses. **Life Sci.**, v. 70, n. 26, p. 3131-3142, May 2002.
- BELEZNAI, T.; BAI, Z. Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. **Vascul. Pharmacol.**, v. 56, n. 3-4, p. 115-121, Mar. 2012. DOI: 10.1016/j.vph.2011.11.003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, May 1976.
- BROUET, A. *et al.* Hsp90 ensures the transition from the early Ca<sup>2+</sup>-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 35, p. 32663-32669, Aug. 2001. DOI: 10.1074/jbc.M101371200.
- BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 12, p. 8410-8413, 1993.
- CHEN, Z. *et al.* Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition. **Mol. Biol. Cell.**, v. 23, n. 7, p. 1388-1399, Apr. 2012. DOI: 10.1091/mbc.E11-09-0811.
- CHEN, Z. *et al.* Reciprocal regulation of eNOS and caveolin-1 functions in endothelial cells. **Mol. Biol. Cell.**, v. 29, n. 10, p. 1190–1202, May 2018. doi: 10.1091/mbc.E17-01-0049.
- CHU, Z. M.; BEILIN, L. J. Mechanisms of vasodilatation in pregnancy: studies of the role of prostaglandins and nitric-oxide in changes of vascular reactivity in the *in situ* blood perfused mesentery of pregnant rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 109, n. 2, p. 322-329, Jun. 1993a. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13573.x.

- CHU, Z. M.; BEILIN, L. J. Nitric oxide-mediated changes in vascular reactivity in pregnancy in spontaneously hypertensive rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, n. 3, p. 1184-1188, Nov. 1993b.
- COELHO, E. B.; BALLEJO, G.; SALGADO, M. C. O. Nitric oxide blunts sympathetic response of pregnant normotensive and hypertensive rat arteries. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 585-588, Sept. 1997.
- CORSON, M. A. *et al.* Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. **Cir. Res.**, v. 79, n. 5, p. 984-991, Nov. 1996.
- COSTA, R. M. *et al.* Increased O-GlcNAcylation of endothelial nitric oxide synthase compromises the anti-contractile properties of perivascular adipose tissue in metabolic syndrome. **Front. Physiol.**, v. 9, p. 341, Apr. 2018. DOI: 10.3389/fphys.2018.00341.
- CRISTOFARO, V.; YALLA, S.V.; SULLIVAN, M. P. Altered caveolar mediated purinergic signaling in spontaneously hypertensive rats with detrusor overactivity. **J. Urol.**, v. 188, n. 3, p. 1017–1026, Sept. 2012. DOI: 10.1016/j.juro.2012.04.100.
- DU, X. L. *et al.* Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. **J. Clin. Investig.**, v. 108, n. 9, p. 1341-1348, Nov. 2001. DOI: 10.1172/JCI11235.
- FERON, O. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 37, p. 22810-22814, Sept. 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.37.22810.
- FERON, O. *et al.* Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 46, p. 30249-30254, Nov. 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.46.30249.
- FISCHER, E. H.; KREBS, E. G. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. **J. Biol. Chem.**, v. 216, n. 1, p. 121-132, Sept. 1955.
- FLEMING, I. *et al.* Ca<sup>2+</sup>-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. **Circ. Res.**, v. 82, n. 6, p. 686–695, Apr. 1998.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur. Heart J.**, v. 33, n. 7, p. 829-837, Apr. 2012. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J. P.; KLEINERT, H. Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB J.**, v. 12, n. 10, p. 773-790, Jul. 1998. DOI: 10.1073/pnas.88.5.1788.

FÖRSTERMANN, U. *et al.* Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, n. 5, p. 1788-1792, Mar. 1991.

FULTON, D. *et al.* Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 597-601, Jun. 1999. DOI: 10.1038/21218.

GARCIA-CARDEÑA, G. *et al.* Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. **Nature**, v. 392, n. 6678, p. 821-824, Apr. 1998. DOI: 10.1038/33934.

GARÇIA-CARDEÑA, G. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 44, p. 27237-27240, Nov. 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.44.27237.

GEISZT, M. NAD(P)H oxidases: new kids on the block. **Cardiovasc. Res.**, v. 71, n. 2, p. 289-299, Jul. 2006. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.05.004.

GOVERS, R. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase and its negative regulator caveolin-1 localize to distinct perinuclear organelles. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 50, n. 6, p. 779-788, Jun. 2002. DOI: 10.1177/002215540205000604.

HANOVER, J. A.; KRAUSE, M. W.; LOVE, D. C. The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1800, n. 2, p. 80-95, Feb. 2010. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.07.017.

HART, G. W. *et al.* Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 841-874, 1989. DOI: 10.1146/annurev.bi.58.070189.004205.

HART, G. W.; HOUSLEY, M. P.; SLAWSON, C. Cycling of O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1017-1022, Apr. 2007. DOI: 10.1038/nature05815.

JU, H. *et al.* Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 30, p. 18522-18525, Jul. 1997. DOI: 10.1074/jbc.272.30.18522.

KIM, D. H. *et al.* Glucosamine increases vascular contraction through activation of RhoA/Rho kinase pathway in isolated rat aorta. **BMB Rep.**, v. 44, n. 6, p. 415-420, Jun. 2011. DOI: 10.5483/BMBRep.2011.44.6.415.

KNOWLES, R. G.; MOCANDA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, v. 298, pt. 2, p. 249-258, Mar. 1994. DOI: 10.1042/bj2980249.

LIMA, V. V. *et al.* High-fat diet increases O-GlcNAc levels in cerebral arteries: a link to vascular dysfunction associated with hyperlipidaemia/obesity? **Clin. Sci.**, v. 130, n. 11, p. 871-880, Jun. 2016. DOI: 10.1042/CS20150777.

LIMA, V. V. *et al.* Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 166-174, Feb. 2009. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.116798.

LIMA, V. V. *et al.* Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli – Vasoactive Peptide Symposium. **J. Am. Soc. Hypertens.**, v. 2, n. 6, p. 410-417, Nov. 2008. DOI: 10.1016/j.jash.2008.06.001.

LIMA, V. V. *et al.* O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter? **Clin. Sci.**, v. 123, n. 8, p. 473-486, Oct. 2012. DOI: 10.1042/CS20110638.

LINDER, A. E. *et al.* Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 314, n. 1, p. 9-15, Jul. 2005. DOI: 10.1124/jpet.105.083634.

LING, W. C. *et al.* Sodium nitrite exerts an antihypertensive effect and improves endothelial function through activation of eNOS in the SHR. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 33048, Sept. 2016. DOI: 10.1038/srep33048.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.

MARSHALL, S.; BACOTE, V.; TRAXINGER, R. R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 8, p. 4706-4712, Mar. 1991.

MASSICOTTE, G. *et al.* Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 65, n. 12, p. 2466–2471, Dec. 1987.

MICHEL, J. B. *et al.* Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 25, p. 15583–15586, Jun. 1997. DOI: 10.1074/jbc.272.25.15583.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, v. 12, n. 4, p. 365-372, Oct. 1988.

MOREIRA, J. E.; REESE, T. S.; KASHAR, B. Freeze-substitution as a preparative technique for immunoelectronmicroscopy: evaluation by atomic force microscopy. **Microsc. Res. Tech.**, v. 33, n. 3, p. 251-261, Feb. 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19960215)33:3<251::AID-JEMT2>3.0.CO;2-T.

MULVANY, M. J.; HALPEN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ. Res.**, v. 41, n. 1, p. 19-26, Jul. 1977. DOI: 10.1161/01.RES.41.1.19.

NATHAN, L.; CUEVAS, J.; CHAUDHURI, G. The role of nitric oxide in the altered vascular reactivity of pregnancy in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, n. 5, p. 955–960, Mar. 1995. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb13297.x.

NGOH, G. A. *et al.* O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. **Cir. Res.**, v. 107, n. 2, p. 171-185, Jul. 2010. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.224675.

OKAMOTO, T. *et al.* Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 10, p. 5419-5422, Mar. 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.10.5419.

OLSEN, J. V. *et al.* Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. **Cell.**, v. 127, n. 3, p. 635-648, Nov. 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.026.

PALLER, M. S. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. **Am. J. Physiol.**, v. 247, n. 1, p. H100-H107, Jul 1984. DOI: 10.1152/ajpheart.1984.247.1.H100.

PARK, H. Y. *et al.* Conformational changes of calmodulin upon Ca<sup>2+</sup> binding studied with a microfluidic mixer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 105, n. 2, p. 542-547, Jan. 2008. DOI: 10.1073/pnas.0710810105.

PATEL, H. H.; MURRAY, F.; INSEL, P. A. Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 48, p. 359-391, 2008. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.48.121506.124841.

PEARL, L. H.; PRODROMOU, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 75, p. 271-294, 2006. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142738.

PIECH, A. *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. **Cardiovasc. Res.**, v. 57, n. 2, p. 456–467, Feb. 2003. DOI: 10.1016/s0008-6363(02)00676-4.

PINHEIRO, T. V. *et al.* Hypertensive disorders during pregnancy and health outcomes in the offspring: a systematic review. **J. Dev. Orig. Health Dis.**, n. 7, v. 4, p. 391-407, Aug. 2016. DOI: 10.1017/S2040174416000209.

POTJE, S. R. *et al.* Reduced caveolae density in arteries of SHR contributes to endothelial dysfunction and ROS production. **Sci. Rep.**, v. 30, n. 9, p. 6696, Apr. 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-43193-8.

PRITCHARD JÚNIOR, K. A. *et al.* Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 21, p. 17621-176214, May 2001. DOI: 10.1074/jbc.C100084200.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Mesenteric arterial function in the rat in pregnancy: role of sympathetic and sensory-motor perivascular nerves, endothelium, smooth muscle, nitric oxide and prostaglandins. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, n. 7, p. 1463-1470, Apr. 1996. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15307.x.

RAZANI, B.; LISANTI, M. P. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 11, p. 1553-1561, Dec. 2001. DOI: 10.1172/JCI14611.

RODRIGUES, G. J. *et al.* Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 323, n. 3, p. 831-837, Dec. 2007. DOI: 10.1124/jpet.107.127241.

RODRIGUES, G. J. *et al.* Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 627, n. 1-3, p. 251-257, Feb. 2010. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.11.010.

RUSSELL, K. S. *et al.* Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 7, p. 5026–5030, Feb. 2000. DOI: 10.1074/jbc.275.7.5026.

SÁNCHEZ, M. *et al.* Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 24, n. 1, p. 75–84, Jan. 2006.

SARAN, M.; MICHEL, C.; BORS, W. Reaction of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup>. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). **Free Radic. Res. Commun.**, v. 10, n. 4-5, p. 221-226, 1990.

SESSA, W. C. eNOS at a glance. **J. Cell. Sci.**, v. 15, n. 117, p. 2427-2429, May 2004. DOI: 10.1242/jcs.01165.

SESSA, W. C. *et al.* The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 30, p. 17641-17644, Jul. 1995. DOI: 10.1074/jbc.270.30.17641.

SEVERS, N. J. Plasma membrane cholesterol in myocardial muscle and capillary endothelial cells. Distribution of filipin-induced deformations in freeze-fracture. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 25, n. 2, p. 289-299, Oct. 1981.

SHAH, V. *et al.* Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 2, p. G463-G468, Aug. 1999. DOI: 10.1152/ajpgi.1999.277.2.G463.

SHAUL, P. W.; ANDERSON, R. G. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 5, p. L843-L851, Nov. 1998. DOI: 10.1152/ajplung.1998.275.5.L843.

SHAUL, P. W. *et al.* Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 11, p. 6518-6522, Mar. 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.11.6518.

SILVA, B. R. *et al.* Phenylephrine activates eNOS Ser 1177 phosphorylation and nitric oxide signaling in renal hypertensive rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 5, n. 738, p. 192-199, Sept. 2014. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.05.040.

SONVEAUX, P. *et al.* Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. **Circ. Res.**, v. 95, n. 2, p. 154-161, Jul. 2004. DOI: 10.1161/01.RES.0000136344.27825.72.

SOUZA-SILVA, L. *et al.* Glycosylation with O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine induces vascular dysfunction via production of superoxide anion/reactive oxygen species. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 96, n. 3, p. 232-240, Mar. 2018. DOI: 10.1139/cjpp-2017-0225.

STENNET, A. K.; KHALIL, R. A. Neurovascular mechanisms of hypertension in pregnancy. **Curr. Neurovasc. Res.**, v. 3, n. 2, p. 131-148, May 2006.

TAKAHASHI, S.; MENDELSON, M. E. Calmodulin-dependent and -independent activation of endothelial nitric-oxide synthase by heat shock protein 90. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 11, p. 9339-9344, Jan. 2003. doi:10.1074/jbc.M212651200.

TANAKA, M. *et al.* Humic acid induces the endothelial nitric oxide synthase phosphorylation at Ser1177 and Thr495 Via Hsp90 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$  upregulation in human umbilical vein endothelial cells. **Environ. Toxicol.**, v. 30, n. 2, p. 223-231, Feb. 2015. DOI: 10.1002/tox.21888.

TORRES, C. R.; HART, G. W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. **J. Biol. Chem.**, v. 259, n. 5, p. 3308-3317, Mar. 1984.

TRAXINGER, R. R.; MARSHALL, S. Coordinated regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity by insulin, glucose, and glutamine. Role of hexosamine biosynthesis in enzyme regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 16, p. 10148-10154, Jun. 1991.

TROIANO, J. A. *et al.* Decreased reactive oxygen species production and NOX1, NOX2, NOX4 expressions contribute to hyporeactivity to phenylephrine in aortas of pregnant SHR. **Life Sci.**, v. 144, p. 178-184, Jan. 2016. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.12.011.



UMANS, J. G.; LEVI, R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 771-790, 1995. DOI: 10.1146/annurev.ph.57.030195.004011.

VERA, R. *et al.* Chronic administration of genistein improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: involvement of eNOS, caveolin and calmodulin expression and NADPH oxidase activity. **Clin. Sci.**, v. 112, n. 3, p. 183–191, Feb. 2007. DOI: 10.1042/CS20060185.

WANG, Y. *et al.* Berberine prevents hyperglycemia-induced endothelial injury and enhances vasodilatation via adenosine monophosphate-activated protein kinase and endothelial nitric oxide synthase. **Cardiovasc. Res.**, v. 82, n. 3, p. 484-492, Jun. 2009. DOI: 10.1093/cvr/cvp078.

WELLS, L.; VOSSELLER, K.; HART, G. W. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2376-2378, Mar. 2001.

WELLS, L. *et al.* Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 3, p. 1755–1761, Jan. 2002. DOI: 10.1074/jbc.m109656200.

WUNDERLICH, C. *et al.* The adverse cardiopulmonary phenotype of caveolin-1 deficient mice is mediated by a dysfunctional endothelium. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 44, n. 5, p. 938–947, May 2008. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2008.02.275.

YAO, Y. *et al.* The differential protein and lipid compositions of noncaveolar lipid microdomains and caveolae. **Cell. Res.**, v. 19, n. 4, p. 497-506, Apr. 2009. DOI: 10.1038/cr.2009.27.

YU, J. *et al.* Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 5, 1284-1291, May 2006. DOI: 10.1172/JCI27100.

ZANCHETA, D. *et al.* The PI3K–Akt–eNOS pathway is involved in aortic hyporeactivity to Phenylephrine associated with late pregnancy in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.**, v.122, p. 78-86, Feb. 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.12.014.

ZEIDAN, Q.; HART, G. W. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. **J. Cell. Sci.**, v. 123, n. 1, p. 13-22, Jan. 2010. DOI: 10.1242/jcs.053678.

ZHAO, Y. Y., MALIK, A. B. A novel insight into the mechanism of pulmonary hypertension involving caveolin-1 deficiency and endothelial nitric oxide synthase activation. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 19, n. 7, p. 238–242, Oct. 2009. DOI: 10.1016/j.tcm.2010.02.003.

ZHAO, Y. Y. *et al.* Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 7, p. 2009-2018, Jul. 2009. DOI: 10.1172/JCI33338.

***ANEXOS***

## ANEXOS

A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-FOA/UNESP).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação de mecanismos de modificação pós-traducional da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) associados a biodisponibilidade do óxido nítrico em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ao final da prenhez**", Processo FOA nº 2015-00730, sob responsabilidade de Cristina Antoniali Silva apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 05 de Agosto de 2015.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 06 de Maio de 2019.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 06 de Junho de 2019.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of post-transductional modification mechanisms of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) associated with the nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats (SHR) in the end of pregnancy**", Protocol FOA nº 2015-00730, under the supervision of Cristina Antoniali Silva presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 05, 2015.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** May 06, 2019.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** June 06, 2019.

Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator